

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DOUGLAS LUÍS VIEIRA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DE POLISSACARÍDEOS DE AVEIA-BRANCA (*Avena
sativa* L.) SOBRE A VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO**

CURITIBA 2017

DOUGLAS LUÍS VIEIRA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DE POLISSACARÍDEOS DE AVEIA-BRANCA (*Avena
sativa* L.) SOBRE A VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Bello Baron
Maurer

**CURITIBA
2017**

V658 Vieira, Douglas Luís

Extração, caracterização química e avaliação da atividade imunomoduladora de polissacarídeos de aveia-branca (*Avena sativa* L.) sobre a via clássica do sistema complemento humano / Douglas Luís Vieira. Curitiba: 2017.

72 f.; il.

Orientador: Marcelo Beltrão Molento

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

1. Aveia. 2. Fitoterapia. 3. Glucanas. 4. Polissacarídeos. I. Molento, Marcelo Beltrão. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 633.13:615.321

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE POLISSACARÍDEOS DE AVEIA-BRANCA (*Avena sativa* L.) SOBRE A VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO" apresentada pelo Mestrando DOUGLAS LUÍS VIEIRA declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2017

Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento
Presidente/Orientador

Professora Dra. Viviane Milczewski
Membro

Dra. Fernanda Bovo
Membro

Aos meus filhos peludos Pirilampo e Vênus
Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rosangela e Valdelino por todo o apoio durante toda minha vida, por me ajudarem emocionalmente e financeiramente sempre que precisei sem vocês eu não seria nada.

Aos meus irmãos Jonathan e Jéssica e meu cunhado Jonatan, mesmo estando longe vocês se fizeram muito presentes durante meu mestrado, vocês são tudo para mim.

A minha família de peludos Pirilampo, Maggie, Chuchu, Maia, Duque, Peluda e Benji, vocês me fazem ter muito orgulho da profissão que eu escolhi.

As minhas melhores amigas curitibanas, Andréia (Deinha), Marcela (Mar) e Vanessa (Vane), vocês se tornaram pessoas muito importantes na minha vida, não consigo me imaginar vivendo sem vocês.

As minhas melhores amigas de Joinville Elisa e Tayná, mesmo quase 200 Km nos separando não esqueci de vocês não. Sempre estarão no meu coração, e não deixem de me visitar ;).

Aos meus amigos Lilian, Kyola, Paulo, Henrique, Marian, Brennda, Fabiano (Gaúcho), Cristiano (Padilha), Nicollas, mesmo eu não estando presente tanto quanto eu queria saibam que minha amizade por vocês não diminuiu.

A minha família Curitibana Mariana (Mari), Vinicius (Vini), Lucas (Masi), Bruno (Piru) e Vênus. Muito obrigado por todo apoio que vocês me deram nesse tempo que convivemos juntos. Não seria nada sem vocês me ajudando nas bads da vida e nos incontáveis momentos maravilhosos que vocês me proporcionaram.

A Carolina Santos, Carol você será minha eterna companheira. Muito obrigado pelos momentos que compartilhei com você, bons (coxinhas da Guarani) e ruins (Intercampi das 17:50) hahahaha. Um agradecimento especial :D

Ao Jeferson (Jeff) você foi muito especial e me deu apoio em momentos difíceis durante essa caminhada. Muito obrigado!!

Aos meus amigos do LDP Izanara (Iza), Luciana (Lu), Carolina A (Carol), Raphael (Rapha), Daisy, Lew (Lewzinho), Guilherme (Gui), Amanda. Sem vocês não teria chegado onde cheguei.

Aos meus amigos do NUPPLAMED Raquely, Fábio (Japa), Andressa, Melina (Mel), Paulo e Monique. Vocês foram parte essencial no desenvolvimento de todo esse trabalho. Muito obrigado!!

A Úrsula e Maria Ângela, vocês não fazem mais parte do LDP, mas saibam que foram essenciais para minha escolha em seguir na pós-graduação, muitíssimo obrigado.

Aos meus amigos da Universidad de Camagüey, Professores Amilcar, Anay e Arnielis. E especialmente a minha negra Yanise, "Tú estás en mi corazón, te quiero mucho <3".

Aos meus roommates nesse período de 2 anos, Carolina, Pâmela, Caroline, Marcus, Marcella e Elisa. Muito obrigado pelos momentos proporcionados.

Aos meus orientadores Prof. Marcelo Beltrão Molento e Prof^a. Juliana Bello Baron Maurer, vocês foram meus grandes mentores, amigos e os responsáveis por me proporcionar o desenvolvimento desse trabalho. Muitíssimo obrigado, quero um dia chegar tão alto quanto vocês.

A Professora Viviane Milczewski minha "mãe científica", a pessoa que desde 2012 me inseriu no meio da Pesquisa e Extensão. Agradeço muitooo por todo o aprendizado, amizade e apoio durante esses anos.

As Professoras Carla Molento, Simone Tostes, Edneia Cavaliere e Selma Faria Baggio. Grandes exemplos a serem seguidos. Muito obrigado por todas as oportunidades e ajudas que vocês me proporcionaram.

A todas as pessoas que passaram pelo LDP e me ajudaram de alguma forma, aos ICs e estagiários Gabriel, Yumi, Gláucia, Ynaê, Laura e Ana Rafaela.

A Dra. Fernanda Bovo por toda ajuda e colaboração nos experimentos do Sistema Complemento.

A Doutoranda Pâmela Fontana por toda ajuda nessa reta final do mestrado, muito obrigado pela sua compreensão.

Ao Dr. Arquimedes Paixão de Santana Filho, responsável técnico do RMN do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pela análise das amostras no RMN.

A todos os residentes do Hospital Veterinário da UFPR, especialmente Luiza Barcellos (Clínica de Grandes) que sempre ajudou quando necessário.

A toda a equipe de funcionários terceirizados da Universidade, não sei como faria sem RU e Intercampi. Um carinho especial para vocês.

A CAPES pela bolsa de mestrado, sem ela não conseguiria me manter em Curitiba para terminar o mestrado.

Ao PPG-Ciências Veterinárias pela oportunidade da realização do mestrado.

A Universidade Federal do Paraná, por toda a estrutura que possibilitou essa pesquisa.

O conceito do absurdo sempre
foi algo que me atraiu.
(*Eraserhead*, 1977) - David Lynch

RESUMO

Entre os cereais, a aveia-branca (*Avena sativa* L) é um cereal com grande importância nutricional e nutracêutica tanto para humanos como animais. As glucanas são os principais constituintes da parede celular dos cereais e apresentam blocos de glucose unidos por ligações glicosídicas (β 1 \rightarrow 3) e (β 1 \rightarrow 6), por isso são denominadas β -glucanas e possuem importante função no sistema imunológico. Vários trabalhos descrevem relatos que demonstram o potencial prebiótico e imunomodulador das β -glucanas. Assim considerando o previamente abordado, a hipótese do presente trabalho é que as glucanas de aveias apresentam potencial imunomodulador sobre a via clássica do sistema complemento. Esta dissertação está organizada em 3 capítulos. O primeiro corresponde uma revisão (capítulo 1) e teve por objetivo abordar a atividade imunomoduladora e como prebiótico de β -glucanas de aveia-branca. O objetivo do capítulo 2, foi demonstrar a extração e a caracterização química de polissacarídeos de aveia. Foram realizadas duas extrações aquosas em temperatura ambiente (25°C) (ASW1 e ASW2) e uma na forma alcalina (ASNaOH). As frações obtidas foram analisadas em relação ao teor de carboidratos totais, proteína total e fenóis totais. Todas as frações apresentaram alto teor de carboidratos (> 60%), quantidades mínimas de proteínas (0,24%) e fenóis (0,04%). A cromatografia de camada delgada foi realizada para determinar a composição de monossacarídeos, a qual apresentou apenas glucose como constituinte. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono treze (^{13}C) foi aplicada para determinar os aspectos estruturais das frações polissacarídicas. Os resultados sugerem que a fração ASW1 apresenta-se constituída de β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) e a fração ASNaOH apresenta além da β -glucana também polissacarídeos amiláceos (amilose e amilopectina), caracterizadas como α -glucana (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6). A extração utilizada foi eficiente para a obtenção de frações abundantes em β -glucana (com rendimento de cerca de 2%), as quais poderão ser utilizadas em pesquisa com nutracêuticos. O capítulo 3 teve por objetivo, investigar o efeito das frações de aveia - ASNaOH e ASNaOHt sobre a via clássica do sistema complemento humano, utilizando o teste *in vitro* de fixação do complemento. A heparina (glicosaminoglicano sulfatado, origem suína) e o zimozam (zymozan, β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae*) foram utilizados respectivamente como controle inibidor e ativador da via clássica do sistema complemento. As frações ASNaOHt, ASNaOH e zimozam não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) em ambos os ensaios de fixação do complemento (sem e com pré-incubação). No entanto, a fração ASNaOHt apresentou ICH_{50} relativamente menor, o que indica que o potencial dose-resposta dessa fração foi maior que o apresentado pelas outras, pois uma dose menor apresentou o mesmo efeito quando comparadas. Em relação ao controle inibidor (heparina), as demais frações apresentaram-se iguais no ensaio com pré-incubação e mais eficazes no ensaio sem pré-incubação, o que indica que essas amostras, a partir da via clássica, são capazes de ativar o sistema complemento e não de inibi-lo, como a heparina. No presente estudo, demonstrou-se a capacidade das β -glucanas obtidas de aveia, ativando a via clássica do sistema complemento humano, apresentando-se como uma importante estratégia terapêutica na saúde animal e humana.

Palavras-chave: β -glucanas, sistema complemento, fitoterapia, imunoestimulante

ABSTRACT

Among the grains, white oat (*Avena sativa* L.) is a cereal with nutritional and nutraceutical importance for both humans and animals. Glucans are the main constituents of the cell wall of cereals and have glucose blocks bound by glycosidic bonds (β 1- \rightarrow 3) and (β 1- \rightarrow 6). These molecules are called β -glucans and have an important function in the immune system. Several scientific reports already have described the prebiotic and immunomodulatory potential of β -glucans. Thus, considering the previously discussed, the hypothesis of the present work is that the glucans of white oat present immunomodulatory potential on the classic pathway of the complement system. This master thesis is organized into three chapters. The first one corresponds to a review (chapter 1) and aimed to discuss the immunomodulatory activity of white oat β -glucans as a prebiotic. The objective of Chapter 2 was to demonstrate the extraction and chemical characterization of oat polysaccharides. Two aqueous extractions were performed at room temperature (25 °C) (ASW1 and ASW2) and one in alkaline form (ASNaOH). The obtained fractions were analyzed for total carbohydrate content, total protein and total phenols. All fractions presented high carbohydrate content (> 60%), minimum amounts of proteins (0.24%) and phenols (0.04%). Thin layer chromatography was performed to determine the composition of monosaccharides; the results revealed only glucose as constituent. Thirteen (13 C) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was applied to determine the structural aspects of the polysaccharide fractions. The results demonstrated that the ASW1 fraction consists of β -glucans (1-3) and (1-4). The ASNaOH fraction presented, in addition to β -glucan, also amylose and amylopectin polysaccharides, characterized as α -glucan (1-4) and (1-6). The extraction was efficient to obtain abundant β -glucan fractions (yield about 2%), which could be used in nutraceutical research. The chapter 3 was developed to investigate the effect of oat fractions - ASNaOH and ASNaOHt on the classical pathway of the human complement system, using the in vitro complement fixation test. Heparin (sulfated glycosaminoglycan, porcine origin) and zymozan (zymozan, β -glucan of *Saccharomyces cerevisiae*) were used, respectively, as inhibitory and activator control of the classical pathway of the complement system. The ASNaOHt, ASNaOH and zymozan fractions showed no significant difference ($P > 0.05$) in both complement fixation assays (without and with preincubation). However, the ASNaOHt fraction had relatively lower ICH 50, it indicates that the potential dose-response of the β -glucan fraction was higher than that presented by the others, because a lower dose had the same effect when compared. In relation to the inhibitor control (heparin), the other fractions were the same in the pre-incubation test and more effective in the assay without preincubation, it indicates that these samples, from the classical pathway, are able to activate the complement system and not inhibit it, such as heparin. In the present study, was demonstrated the ability of β -glucans, obtained from oat, to activate the classical pathway of the human complement system, it highlights these molecules as important therapeutic strategy in animal and human health.

Key words: β -glucans, complement system, phytotherapy, immune-stimulant

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	AÇÃO DE PREBIÓTICOS NA MUCOSA DO TRATO GASTRINTESTINAL.....	22
FIGURA 2 -	DISTRIBUIÇÃO DOS ARTIGOS SOBRE POLISSACARÍDEOS PREBIÓTICOS ENCONTRADOS NA PLATAFORMA DE PESQUISA SCOPUS ENTRE 1974 E 2016.....	26
FIGURA 3 -	PERFIL MONOSSACARÍDICO OBTIDO EM CROMATOGRAFIA POR CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES ASW1 E ASNAOH.....	42
FIGURA 4 -	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹³ C DA FRAÇÃO ASW1 (EXTRAÇÃO AQUOSA).....	44
FIGURA 5 -	ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹³ C DA FRAÇÃO ASNAOH (EXTRAÇÃO ALCALINA COM NAOH).....	45
FIGURA 6 -	EXPLICAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INIBIÇÃO (A) OU ATIVAÇÃO (B) DA VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO UTILIZANDO ENSAIOS HEMOLÍTICOS.....	58
FIGURA 7 -	EFEITO DAS FRAÇÕES β-GLUCANA, AMIDO, HEPARINA E ZIMOZAM NA HEMÓLISE INDUZIDA PELA VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO DE SORO HUMANO.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DE CARBOIDRATO TOTAL, PROTEÍNA TOTAL E FENÓIS TOTAIS DAS FRAÇÕES DE AVEIA-BRANCA (ASW1, ASW2 E ASNaOH).....	41
TABELA 2	- DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DE CARBOIDRATO TOTAL, PROTEÍNA TOTAL E FENÓIS TOTAIS DAS FRAÇÕES DE AVEIA-BRANCA (ASW1, ASW2 E ASNAOH).....	45
TABELA 3	- CONTROLES HEMÓLISE TOTAL, 0% DE HEMÓLISE, 100% DE HEMÓLISE E BRANCO DO SORO, UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE ATIVAÇÃO DA VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO HUMANO.....	59
TABELA 4	- VALORES DE CONCENTRAÇÃO DA FRAÇÃO NECESSÁRIA PARA INIBIR 50% DA HEMÓLISE (ICH_{50}) INDUZIDA PELA VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - por cento

= - igual

> - maior

± - desvio padrão

µg - microgramas

µg/ml - microgramas por mililitro

µl - microlitro

µm - micrometros

AGP - arabinogalactana-proteína

ASNaOH - extração alcalina de *Avena sativa* com hidróxido de sódio

ASNaOHt - fração alcalina de *Avena sativa* tratada com α-amilase

ASW1 - fração obtida da 1ª extração aquosa de *Avena sativa*

ASW2 - fração obtida da 2ª extração aquosa de *Avena sativa*

C1 - carbono 1

C2 - carbono 2

C3 - carbono 3

C4 - carbono 4

C5 - carbono 5

C6 - carbono 6

CaCl₂ - cloreto de cálcio

CCD - cromatografia de camada delgada

D₂O - água deuterada

EtOH - etanol

g - grama

G - giros

g/100 g - grama por 100 gramas

h - hora

H₂O - água

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

ICH₅₀ - concentração inibitória de hemólise 50%

IgA - imunoglobulina do tipo A

KDa - quilodaltons

M - molar

m/v - massa por volume

MAC - complexo de ataque a membrana

mg/ml - miligramas por mililitro

MgCl₂ - cloreto de magnésio

MHz - mega-hertz

min - minuto

ml - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

Na₂CO₃ - carbonato de sódio

Na₂HPO₄ - fosfato de sódio dibásico

Na₃PO₄ - fosfato de sódio monobásico

NaOH - hidróxido de sódio

nm - nanômetro

°C - graus Celsius

P - probabilidade

pH - potencial hidrogeniônico

ppm - partes por milhão

R² - coeficiente de determinação

R_f - fator de retenção

RMN: ressonância magnética nuclear

RPM - rotações por minuto

TFA - ácido trifluoracético

TGI - trato gastrointestinal

TLAM - tecido linfoide associado à mucosa

v/v - volume por volume

δ - pico de assinalamento

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1: Atividade Imunomoduladora e Prebiótica de β -glucanas de Aveia-branca (<i>Avena sativa</i> L.): Revisão de Literatura.....	18
1.1 RESUMO.....	18
1.2 ABSTRACT.....	18
1.3 INTRODUÇÃO.....	19
1.4 AÇÃO DOS PREBIÓTICOS NO TRATO GASTRINTESTINAL.....	20
1.5 β -GLUCANAS COMO PREBIÓTICOS E IMUNODULADORES.....	23
1.6 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA SOBRE POLISSACARÍDEOS PREBIÓTICOS.....	25
1.7 CONCLUSÕES.....	27
1.8 REFERÊNCIAS.....	27
1.9 HIPÓTESE.....	31
1.10 OBJETIVO GERAL.....	31
1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
2. CAPÍTULO 2: Extração e caracterização química de polissacarídeos de grãos de aveia-branca (<i>Avena sativa</i> L.).....	32
2.1 RESUMO.....	32
2.2 ABSTRACT.....	32
2.3 INTRODUÇÃO.....	33
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.4.1 Material Vegetal.....	35
2.4.2 Inativação Enzimática.....	36
2.4.3 Extrações Aquosas em 25°C e Alcalina.....	36
2.4.4 Remoção enzimática do amido.....	37
2.4.5 Dosagens Colorimétricas.....	37
2.4.5.1 Compostos Fenólicos.....	37
2.4.5.2 Proteína Total.....	38
2.4.5.3 Carboidrato Total.....	39
2.5 Determinação da Composição monossacarídica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	39
2.6 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	40
2.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40

2.7.1 Dosagens colorimétricas.....	40
2.7.2 Determinação da Composição monossacarídica por CCD.....	41
2.7.3 Análises de espectroscopia de RMN- ¹³ C das frações ASW1 e ASNaOH.....	42
2.8 CONCLUSÃO.....	46
2.9 AGRADECIMENTOS.....	46
2.10 REFERÊNCIAS.....	47
3. CAPÍTULO 3: Efeitos moduladores de polissacarídeos de grãos da aveia-branca (<i>Avena sativa</i> L.) sobre a via clássica do sistema complemento humano.....	51
3.1 RESUMO.....	51
3.2 ABSTRACT.....	51
3.3 INTRODUÇÃO.....	52
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.4.1 Material Vegetal.....	54
3.4.2 Preparo das frações.....	54
3.4.3 Controles de inibição e ativação.....	55
3.4.4 Preparo da Papa de Eritrócitos.....	55
3.4.5 Teste Hemolítico das Frações.....	55
3.4.6 Preparo do Soro Humano.....	55
3.4.7 Teste Hemolítico de fixação do sistema complemento.....	56
3.4.8 Controles experimentais.....	57
3.4.9 Análise Estatística.....	57
3.5 RESULTADOS.....	59
3.6 DISCUSSÃO.....	61
3.7 CONCLUSÃO.....	64
3.8 AGRADECIMENTOS.....	65
3.9 REFERÊNCIAS.....	65
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
5. VITA.....	71
6. REFERÊNCIAS GERAIS.....	74

1. CAPÍTULO 1: Atividade Imunomoduladora e Prebiótica de β -glucanas de Aveia-branca (*Avena sativa* L.): Revisão de Literatura

Artigo a ser submetido para a Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

Atividade Imunomoduladora e Prebiótica de β -glucanas de Aveia-branca (*Avena sativa* L.): Revisão de Literatura

VIEIRA, D.L.^{1*}; MAURER, J.B.B.²; BUZATTI, A.¹; MOLENTO, M.B.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, 80035050 Curitiba – PR, Brasil. ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, 81531990 Curitiba – PR, Brasil. * Autor para correspondência.

RESUMO: A saúde intestinal, fator importante para a sanidade animal e humana está intimamente relacionada com a população da microbiota do trato gastrointestinal. Correlacionado com esse fato, está a dieta fornecida, que é fundamental para o desenvolvimento e proliferação de bactérias benéficas. A modulação da microbiota intestinal pode ser dada pela atividade prebiótica de alguns polissacarídeos, os quais quando capazes de passar intactos pela atividade de enzimas digestivas, são fermentados por essas bactérias. Dentre esses polissacarídeos, β -glucanas as quais apresentam blocos de glucose unidos por ligações glicosídicas (β 1 \rightarrow 3) e (β 1 \rightarrow 6) provenientes de leveduras e algas já foram relatadas com potencial prebiótico e modulador de resposta imune. As β -glucanas também estão presentes na parede celular dos cereais e apresentam propriedades imunomoduladoras e potencial prebiótico. A composição bioquímica dos grãos de aveia-branca (*Avena sativa* L.) indica o seu alto valor nutritivo, tanto para humanos, como para os animais. A presente revisão descreve utilização de polissacarídeos como potenciais prebióticos, dando enfoque em cereais principalmente na aveia.

Palavras-chave: Polissacarídeos de cereais, sistema imunológico, terapia alternativa

ABSTRACT: Intestinal health, an important sanitary factor for animal and human, is closely related to the microbiota population of the gastrointestinal tract. Correlated with this fact, is the diet provided, being fundamental for the development and proliferation of beneficial bacteria. The modulation of the intestinal microbiota can be achieved by the prebiotic activity of some polysaccharides, which when able to pass intact by the activity of digestive enzymes, are fermented by these bacteria. Among these polysaccharides, the β -glucans, which present glucose blocks bound by glycosidic (β 1 \rightarrow 3) and (β 1 \rightarrow 6), originated from yeasts and algae have already been reported with prebiotic potential and as an immune response modulator. The B-glucans are also present in the cell wall of cereals and have immunomodulatory properties and prebiotic potential. The biochemical composition of white oat (*Avena sativa* L.) indicates their high nutritional value, both for humans and for animals. This review describes the use of polysaccharides as potential prebiotics, focusing on cereals mainly in oats.

Key words: Cereal polysaccharides, immune system, alternative therapy

INTRODUÇÃO

Prebióticos são compostos não digestíveis pelo organismo animal, mas seletivamente fermentados por micro-organismos da microbiota do trato gastrointestinal (TGI) (Gibson e Roberfroid, 1995; Licht, 2012). Gibson e Roberfroid (1995) afirmam que prebiótico é classificado como um ingrediente alimentar que deve apresentar três características; 1) resistir à acidez gástrica, hidrólise por enzimas de mamíferos e absorção gastrintestinal, 2) ser fermentado pela microbiota intestinal e 3) estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade das bactérias intestinais associadas à saúde e ao bem-estar humano e animal. Na atualidade, esses compostos são uma importante alternativa aos promotores de crescimento, atuando como reguladores do equilíbrio da microbiota do TGI, especialmente em animais imunossuprimidos (Silva e Nornberg, 2003).

A principal forma de ação dos prebióticos é atuar na modulação da microbiota do hospedeiro. Acredita-se que alguns prebióticos possam agir sobre a translocação intestinal de patógenos, impedindo a aderência às células epiteliais e ativando a resposta imune adquirida (Silva e Nornberg, 2003). Os efeitos resultantes do uso de prebióticos são evidenciados pelo crescimento das populações microbianas benéficas, pela melhora nas condições luminiais, e no tamanho das vilosidades do TGI e no sistema imunológico e, em alguns casos, pela melhora no desempenho animal, principalmente associados com ganho de peso. (Silva e Nornberg, 2003).

O TGI exerce um papel importante na proteção do organismo contra infecções e outras doenças, por atuar contra a invasão de patógenos, neutralizar toxinas e agir na resposta imune local. A saúde do TGI é muitas vezes aferida indiretamente pelo tipo de população microbiana, volume das fezes e sua consistência, componentes do odor fecal e os índices relacionados ao sistema imunológico. Estratégias alimentares, como suplementação da ração, formato do alimento (ex. ração peletizada), período e quantidade no fornecimento são usadas para melhorar ou manter a saúde intestinal, dentre elas o uso de prebióticos e/ou probióticos (Fahey, 2004).

Há relatos de micro-organismos que atuam modulando a integridade imunológica e a microbiota intestinal, impedindo que as bactérias patogênicas presentes no cólon se liguem ao epitélio intestinal, uma vez que competem pelo mesmo sítio de ligação. Além disto, a fermentação dos polissacarídeos no intestino dos cães pode aumentar a população de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, bactérias desejáveis no trato gastrointestinal. A microbiota benéfica auxilia a digestão e absorção de nutrientes, produz vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminui, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (Silva e Nornberg, 2003). Este mecanismo acontece da seguinte forma: para que populações de bactérias indesejáveis colonizem o TGI é preciso inicialmente, aderir às células epiteliais. Esta fixação ocorre por meio das fímbrias ou glicocalix. Em muitos casos, o elo entre os glicocálixes é a lectina, que se liga especificamente a um único carboidrato (Silva e Nornberg, 2003). Existem evidências de que os polissacarídeos baseados em mananas, galactanas e glucanas atuam exatamente nesta fase de colonização, ligando-se às fímbrias e tornando-as indisponíveis para a aderência de bactérias patogênicas, as quais perdem a sua capacidade de colonização e são eliminadas do TGI (Silva e Nornberg, 2003).

AÇÃO DOS PREBIÓTICOS NO TRATO GASTRINTESTINAL

A saúde intestinal, fator importante para a sanidade animal e humana, está intimamente relacionada com a população da microbiota do TGI. Correlacionado com esse fato, está a dieta fornecida que é fundamental para o desenvolvimento e proliferação de bactérias benéficas (Silva e Nornberg, 2003).

A modulação da microbiota intestinal pode ser dada pela atividade prebiótica de alguns polissacarídeos com mananas, galactanas e glucanas em sua composição; exemplo de β -glucanas. Os quais, quando capazes de passar intactos pela atividade de enzimas digestivas (ex. carboidrases), são fermentados por bactérias como *Lactobacillus*

e *Bifidobacterium* (Licht et al., 2012). Componentes prebióticos promovem ações como; a estimulação do sistema imunológico, o combate a invasão de micro-organismos patogênicos, a produção de ácidos graxos de cadeia curta com a acidificação do cólon e a adequação do tempo de trânsito intestinal (Gomes, 2009). Outro efeito adicional dos prebióticos é inibir a multiplicação de patógenos, como enterobactérias, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Esses componentes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora possam ter também algum impacto sobre os micro-organismos do intestino delgado (Gilliland, 2001; Mattila-Sandholm et al., 2002).

Algumas moléculas, como por exemplo os carboidratos, dentre eles as glucanas, galactanas e mananas, têm demonstrado excelente potencial prebiótico e imunomodulador (Licht et al., 2012). Os carboidratos podem ser fermentados por bactérias, multiplicando a população desses micro-organismos (Figura 1) e consequentemente promovendo melhoria na saúde intestinal do indivíduo (Saad, 2006). Ao estimular o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico, os prebióticos atuam indiretamente e de forma benéfica sobre o sistema imunológico do hospedeiro. Isto ocorre porque estas populações bacterianas produzem substâncias com propriedades imunoestimulatórias (lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicoicos) que interagem com o sistema imunológico em vários níveis, incluindo a produção de citocinas, a proliferação de células mononucleares, a fagocitose macrofágica e a indução na síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas, em especial as IgA (Macfarlane e Cummings, 1999; Licht et al., 2012). Yasui e Ohwaki (1991) demonstraram em seu estudo que camundongos BALB/c que receberam alimentação baseada em leite fermentado (lactose, dissacarídeo composto por glucose e galactose) por bactérias do gênero *Bifidobacterium* apresentaram aumento de células do tipo linfócito B e aumento na produção de anticorpos IgA responsáveis pela proteção humoral da mucosa do TGI.

A entrada de micro-organismos nas células epiteliais intestinais, resulta na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e TNF- α). Dessa forma, a resposta à invasão bacteriana ativa sinais intracelulares que levam à iniciação e à amplificação de uma resposta inflamatória aguda. Para manter a integridade da função dessa barreira celular, as superfícies das mucosas são providas com uma resposta inata e adaptativa, a qual tem como componente o tecido linfoide associado a mucosa intestinal (TLAM) (He et al., 2016). Quando ocorre o estímulo imunológico da mucosa é desencadeada a produção de IgA nas placas de Peyer, esses anticorpos bloqueiam os receptores dos patógenos e reduzem o número de bactérias patogênicas no lúmen intestinal. A produção constante de IgA ocorre devido à estimulação contínua pela microbiota normal do intestino. O principal modo de ação da IgA é evitar a aderência de bactérias e vírus às superfícies das mucosas, um processo denominado exclusão imunológica (Figura 1). Antígenos de alimentos e micro-organismos têm capacidade de interagir com a mucosa e induzir reações e processos reguladores (Deshmukh, 2008).

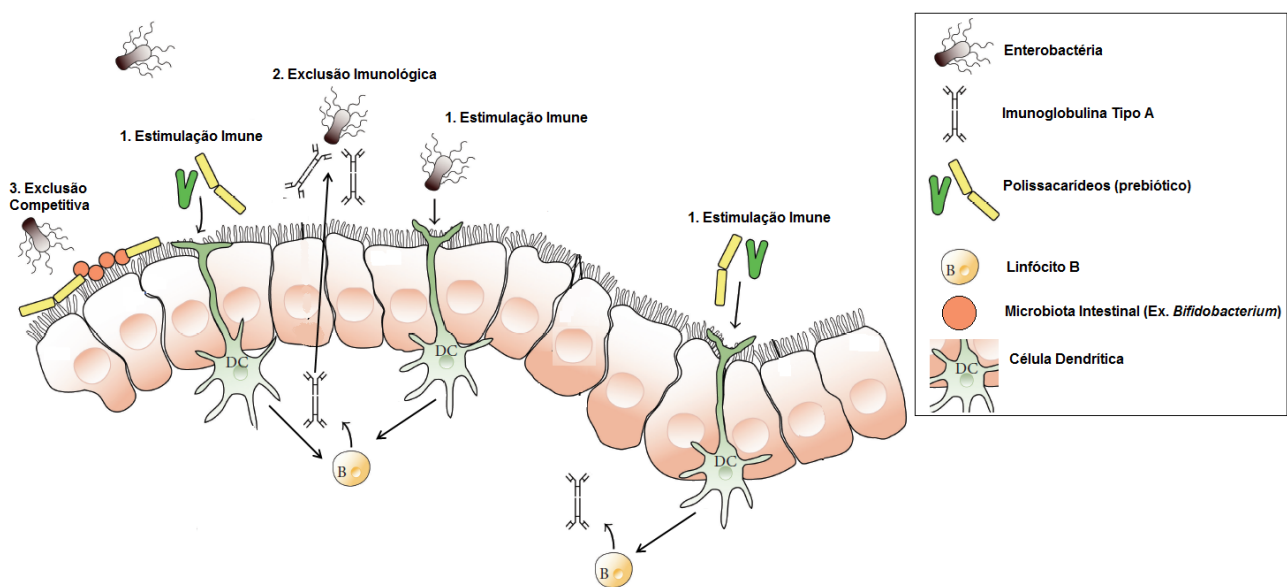


Figura 1. Ação de prebióticos na mucosa do trato gastrointestinal.

1: Estimulação de células dendríticas (DC) por patógenos (enterobactérias) e/ou pelo prebiótico (polissacarídeos), levando a DC a liberar sinais de ativação para o linfócito B que inicia a produção de Imunoglobulinas A (IgA). 2: IgA ligando-se aos patógenos impedindo a fixação desse na mucosa intestinal, processo denominado exclusão imunológica. 3: Processo de exclusão competitiva, onde os prebióticos estimulam o crescimento da microbiota intestinal impedindo a ligação de patógenos na mucosa por falta de receptores disponíveis. Fonte: Khalighi et al. (2016).

β -GLUCANAS DE AVEIA-BRANCA (*Avena sativa* L.) COMO PREBIÓTICOS E IMUNODULADORES

Os principais constituintes da parede celular dos cereais, as glucanas, apresentam os seus blocos de glucose unidos por ligações glicosídicas (β 1 \rightarrow 3) e (β 1 \rightarrow 6), por isso são denominadas β -glucanas e possuem importante função no sistema imunológico, pois atuam nos animais estimulando as células fagocíticas (Zaine, 2010). Medzhitov e Janeway Junior (2000) afirmaram que a porção majoritária dos polissacarídeos (β -glucanas) formadores da parede celular de grãos e leveduras é reconhecida pela capacidade de promover a modulação do sistema imunológico de vários organismos vivos, desde insetos até humanos, por meio de interações específicas com diferentes células imunocompetentes.

β -glucanas provenientes de leveduras e algas já foram relatadas com potencial prebiótico e modulador de resposta imune. Sabe-se que as moléculas de β -glucanas obtidas, tanto de cereais como de leveduras e algas, apresentam conformações semelhantes (β 1 \rightarrow 3 e β 1 \rightarrow 4). Portanto, as β -glucanas obtidas de aveia-branca também devem apresentar potencial prebiótico e imunomodulador, fato esse que torna importante o desenvolvimento de pesquisas acerca desse tema (Sterna et al., 2016).

A aveia-branca é um grão muito utilizado na alimentação de humanos e animais, e reconhecidamente apresenta ações terapêuticas como atividade antitumoral e diminuição do colesterol sanguíneo, além de outras atividades, principalmente devido à presença do polissacarídeo β -glucana, em sua parede celular (Arena et al., 2016). Este cereal originário da Europa Ocidental, pertencente à família Poaceae, tem alto teor e qualidade proteica, variando de 9,7 a 17,3% no grão descascado. Sua concentração de lipídios varia de 5,2 a 12,4% e apresenta 13,66 a 30,17 g/100 g de fibra alimentar total, características essas responsáveis pelos efeitos nutritivos à saúde (Sterna et al., 2016). É um

componente importante na alimentação de crianças, por possuir alto valor nutricional, ser hipoalergênica, altamente palatável, apresentar tempo de validade prolongado, estabilidade e baixo custo (Labanowska et al., 2016). A discussão sobre o valor dietético dos grãos de aveia e sua adequação à produção de alimentos funcionais foi relatada por Biel et al. (2009) e Labanowska et al. (2016).

Entre os carboidratos presentes na aveia-branca, o amido (α -glucana) com natureza insolúvel em água na temperatura ambiente (25 °C) é o constituinte em maior abundância nos grãos, com teores médios de 27,3 a 50,01%. As fibras solúveis em água fria presentes em grande concentração (2,70 a 3,50 g/100 g) são as β -glucanas, que são componentes estruturais da parede celular do grão (Sterna et al., 2016). As β -glucanas são polissacarídeos lineares, compostos por unidades de glucose unidas pelas ligações glicosídicas β - (1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) (Mikkelsen et al., 2013). Algumas atividades biológicas dessas moléculas são a diminuição do colesterol plasmático total, atividade antioxidante (Alrahmany & Tsopmo, 2012) e antitumoral (Choromanska et al., 2015).

Em comparação com outros cereais, o grão de aveia é caracterizado por uma maior quantidade de proteína total e gordura bruta e um menor grau de fibra bruta. A característica desta proteína está na sua composição de aminoácidos de elevado valor nutritivo (Biel et al., 2009).

A composição bioquímica dos grãos de aveia classifica o seu valor nutritivo como 'muito alto', tanto para humanos, como para animais. Entre os cereais, a aveia é o que possui o maior conteúdo lipídico (Labanowska et al., 2016), e dependendo do cultivar, varia em 3 a 10% (Biel et al., 2009, Piatkowska et al., 2010), com genótipos contendo até 18% de gordura. Ao contrário de outros cereais, a maior parte das gorduras em grãos de aveia está localizada no endosperma (Labanowska et al., 2016, Piatkowska et al., 2010).

As diferenças em ligação, ramificação de cadeia, peso molecular, e uma solução de conformação, contribuem para a mudança entre as atividades biológicas das β -glucanas,

obtidas nas várias fontes disponíveis (ex. cereais, leveduras e microalgas). Esses carboidratos já foram relatados com potencial imunomodulador (Murphy et al., 2008). Volman et al. (2010) demonstraram o efeito prebiótico benéfico (ativa o fator de transcrição imunológico central NF- κ B (fator nuclear kappa B) e a secreção de citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70) em dietas com as β -glucanas (1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4) obtidas de aveia na dieta de camundongos. Os autores avaliaram 16 camundongos que receberam por meio de gavagem, 3 mg de β -glucanas (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) de aveia, administradas duas vezes por dia, durante 3,5 dias. Além disso, as β -glucanas foram descritas como altamente fermentáveis pela microbiota intestinal no ceco e no cólon, e relacionadas com o aumento da taxa de crescimento (5,3 até 6,7 log₁₀ UFC /ml⁻¹) e produção de ácido láctico de micro-organismos isolados a partir de intestino humano (Kedia et al., 2008). Choromanska et al. (2015) demonstraram em seu estudo, o efeito antitumoral (diminuição de 51%) de frações de β -glucanas (1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4) provenientes de aveia sobre células tumorais (*Human Pigmented Malignant Melanoma*), concluindo que esse polissacarídeo apresenta ótimo potencial terapêutico, por ter forte atividade antitumoral e não possuir toxicidade. Estudos realizados com cevada e aveia demonstraram o potencial desses polissacarídeos como imunomoduladores, prebióticos e antitumorais, no entanto somente com trabalhos *in vitro* (cultivo celular e testes microbiológicos) (Choromanska et al., 2015; Kedia et al., 2008) ou camundongos (Volman et al., 2010), já descritos acima.

PESQUISA BIBLIOGRÁFICA SOBRE POLISSACARÍDEOS PREBIÓTICOS

Foi realizada busca na plataforma *Scopus* (<http://www.scopus.com>), com o objetivo de quantificar o número de artigos sobre "polissacarídeos prebióticos" já publicados, para observar a relevância de pesquisas nesse assunto, entre os anos 1974 e 2016. Utilizando o termo de busca *Prebiotic polysaccharides* (polissacarídeos prebióticos) foi encontrado

um total de 565 artigos científicos (Figura 2). Ao aprofundar a pesquisa, foram utilizados termos específicos como; *plants prebiotic polysaccharides* (polissacarídeos prebióticos de plantas), *fungus prebiotic polysaccharides* (polissacarídeos prebióticos de fungos) e *yeasts prebiotic polysaccharides* (polissacarídeos prebióticos de leveduras), sendo encontrado 101 artigos para plantas, 20 artigos para fungos e 23 artigos para leveduras. Para os termos mais específicos: *cereals prebiotic polysaccharides* (polissacarídeos prebióticos de cereais) e *oat prebiotic polysaccharides* (polissacarídeos prebióticos de aveia) foi encontrado 30 e 8 artigos, respectivamente.

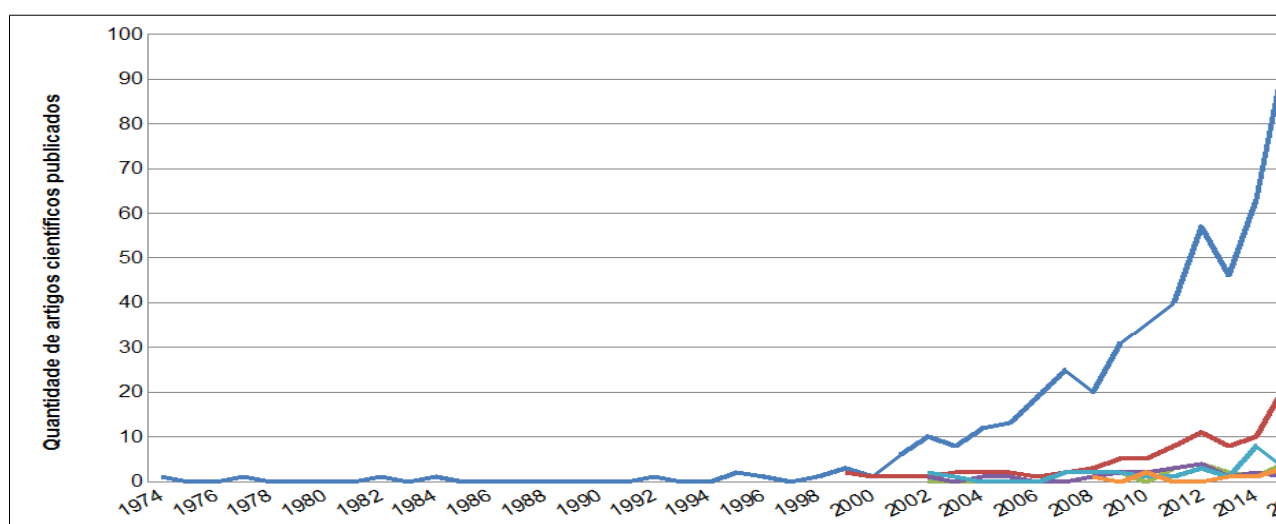


Figura 2. Distribuição dos artigos sobre polissacarídeos prebióticos encontrados na plataforma de pesquisa Scopus entre 1974 e 2016. Os termos de indexação utilizados para a pesquisa foram *plants prebiotic polysaccharides* (para plantas), *fungus prebiotic polysaccharides* (para fungos), *yeasts prebiotic polysaccharides* (para leveduras), *cereals prebiotic polysaccharides* (para cereais) e *oat prebiotic polysaccharides* (para aveia).

Apenas os artigos que apresentaram os termos de indexação supracitados no seu título, nas palavras-chave e/ou resumo foram contabilizados. Foi observado que o maior número de pesquisas se concentrou em trabalhos com plantas, e que o número de trabalhos com cereais e principalmente com aveia é baixo, mesmo atualmente. Também foi observado o aumento do interesse por esse tema a partir do ano de 1999 e início dos anos 2000. Assim, é válido o desenvolvimento de novas pesquisas relacionando polissacarídeos de aveia com a atividade prebiótica, associadas ao sistema imunológico.

CONCLUSÕES

Cereais são uma importante fonte de β -glucanas e têm sido pouco explorados, no que se refere às atividades desses alimentos como nutracêuticos e superalimentos. A expectativa para que β -glucanas de aveia apresentem potencial prebiótico e imunomodulador tanto em animais como em humanos é grande, tendo em vista os vários relatos associados a partir de testes *in vitro* utilizando frações de β -glucanas presentes na aveia, cevada e leveduras, podendo ser uma alternativa viável para a terapêutica.

REFERÊNCIAS

- ALRAHMANY, R; TSOPMO, A. Role of carbohydrases on the release of reducing sugar, total phenolics and on antioxidant properties of oat bran. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 413-418, 2012.
- ARENA, M.P.; RUSSO, P; FIOCCO, D; CAPOZZI; SPANO, G. β -glucans and Synbiotic Foods. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. (Org.). **Probiotics, Prebiotics, and Symbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion**. Londres: Academic Press, 2016. cap. 28, p. 423-430.
- BIEL, W.; BOBKO, K.; MACIOROWSKI, R. Chemical composition and nutritive value of husked and naked oats grain. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 413–418, 2009.
- CHOROMANSKA, A. et al. Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan—An in vitro study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 23-28, 2015.
- DESHMUKH, A. O sistema imunológico e seu papel como um sistema protetor para cães. In: **Sistemas de proteção natural em caninos**. São Paulo: Proplan Purina, 2008. p. 1-15.

- FAHEY, G.C. Prebiotic use by companion animals. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 228, n. 1, p. 36, 2004.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p.1401-1412, 1995.
- GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. (Org.). **Applied Dairy Microbiology**. Nova York: Marcel Dekker, 2001. p.327-343.
- GOMES, M.O.S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- HE, S. et al. Isolation and prebiotic activity of water-soluble polysaccharides fractions from the bamboo shoots (*Phyllostachys praecox*). **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 295-304, 2016.
- KHALIGHI, A; BEHDANI, R; KOUHESTANI, S. Probiotics: A Comprehensive Review of Their Classification, Mode of Action and Role in Human Nutrition. In: RAO, V; RAO, L. (Org.). **Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health**. Toronto: InTech, 2016. cap. 2, p. 21-39.
- KEDIA, G.; VÁZQUEZ, J.A.; PANDIELLA, S.S. Evaluation of the fermentability of oat fractions obtained by debranning using lactic acid bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 4, p. 1227-1237, 2008.

- LABANOWSKA, M. et al. The impact of biochemical composition and nature of paramagnetic species in grains on stress tolerance of oat cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v. 199, p. 52-66, 2016.
- LICHT, T.R.; EBERSBACH, T.; FROKIAER, H. Prebiotics for prevention of gut infections. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 2, p. 70-82, 2012.
- MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, v. 18, p. 999-1003, 1999.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.
- MIKKELSEN, M.S. et al. Molecular structure of large-scale extracted β -glucan from barley and oat: identification of a significantly changed block structure in a high β -glucan barley mutant. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 130-138, 2013.
- MURPHY, E. A et al. Benefits of oat β -glucan on respiratory infection following exercise stress: role of lung macrophages. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 5, p. R1593-R1599, 2008.
- PIATKOWSKA, E.; WITKOWICZ, R.; PISULEWSKA, E. Podstawowy skład chemiczny wybranych odmian owsa siewnego. **Zywnosc Nauka Technologia Jakosc.** v. 3, n. 70, p. 88-99, 2010.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: O estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SILVA, L.P.; NORBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.983-990, 2003.

STERNA, V; ZUTE, S; BRUNAVA, L. Oat Grain Composition and its Nutrition Benefice. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 8, p. 252-256, 2016.

VOLMAN, J.J. et al. Dietary (1→ 3), (1→ 4)-β-d-glucans from oat activate nuclear factor-κB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 40-48, 2010.

YASUI, H.; OHWAKI, M. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with Bifidobacterium breve. **Journal Dairy Science**, v. 74, p. 1187-95, 1991.

ZAINE, L. **Avaliação do efeito de derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre a resposta imune de cães adultos**. 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

1.9 HIPÓTESE

A aveia-branca (*Avena sativa* L.) é um cereal rico em β -glucanas, e esses polissacarídeos são ativadores da via clássica do sistema complemento.

1.10 OBJETIVO GERAL

Extrair e caracterizar polissacarídeos de aveia-branca (*Avena sativa* L.), e determinar seu efeito sobre a via clássica do sistema complemento.

1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extrair polissacarídeos de aveia-branca e avaliar qual melhor método de extração;
- b) Caracterizar quimicamente polissacarídeos de aveia-branca;
- c) Avaliar a ação imunomoduladora de polissacarídeos de aveia-branca determinando suas ações sobre a via clássica do sistema complemento humano, a partir de ensaios hemolíticos.

2. CAPÍTULO 2: Extração e caracterização química de polissacarídeos de grãos de aveia-branca (*Avena sativa* L.)

Artigo formatado para ser submetido na Revista Brasileira de Plantas Medicinais

Extração e caracterização química de polissacarídeos de grãos de aveia-branca (*Avena sativa* L.)

VIEIRA, D.L.^{1*}; MAURER, J.B.B.²; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.²; BUZATTI, A.¹, SPRENGER, L.K.¹; SOLDERA-SILVA, A.²; SEYFRIED, M.²; MOLENTO, M.B.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, 80035050 Curitiba – PR, Brasil. ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, 81531990 Curitiba – PR, Brasil. * Autor para correspondência.

RESUMO: Os compostos bioativos de plantas são uma fonte de pesquisa para a obtenção de novos produtos e são alternativas importantes para a fitoterapia. A aveia (*Avena sativa* L.) é amplamente utilizada na alimentação humana e animal, e apresenta efeitos terapêuticos devido à presença do polissacarídeo β -glucana em sua parede celular. Estas moléculas são polissacarídeos lineares compostos por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4 e β 1 \rightarrow 3. As atividades biológicas descritas para estas moléculas são antitumoral, antitrombótica e antioxidante. O objetivo deste estudo foi demonstrar o protocolo de extração e a caracterização química de polissacarídeos de aveia. Foram realizadas duas extrações aquosas em temperatura ambiente (25°C): ASW1 e ASW2 e uma na forma alcalina: ASNaOH. As frações obtidas foram analisadas em relação ao teor de carboidratos totais, proteína total e fenóis totais. Todas as frações apresentaram alto teor de carboidratos (> 60%), quantidades mínimas de proteínas (0,24%) e fenóis (0,04%). A técnica de cromatografia de camada delgada foi realizada para determinar a composição de monossacarídeos, sendo observado somente glicose. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ¹³C foi aplicada para determinar os aspectos estruturais das frações de polissacarídeos. A análise dos espectros de RMN sugeriu a presença de β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) nas frações de ASNaOH e ASW1 e amido (α -glucana) na fração ASNaOH. A extração utilizada foi eficiente para a obtenção de frações abundantes em β -glucana, as quais podem ser utilizadas em pesquisa como nutracêuticos.

Palavras-chave: RMN-¹³C, β -glucanas (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4), Polissacarídeos de cereais, terapia alternativa.

ABSTRACT: Plant bioactive compounds are a source for obtaining new products and important alternatives for phytotherapy. The oat (*Avena sativa* L.) is widely used as food for humans and livestock production, with therapeutic effects due the presence of β -glucan polysaccharides in its cell wall. These molecules are linear polysaccharides composed by glucose units joined by β 1 \rightarrow 4 and β 1 \rightarrow 3 glycosidic bonds. The biological activities of these molecules are antitumoral, antithrombotic and antioxidant activity. This study aimed to demonstrate the extraction protocol and phytochemical characterization of oat polysaccharides. For this, we performed two room temperature (25°C): ASW1 and ASW2 and one alkaline: ASNaOH extractions. The obtained fractions were analyzed by spectrophotometry for total carbohydrate content, total protein and total phenols. All fractions showed high carbohydrate (> 60%) content, minimum amounts of proteins (0.24%) and phenols (0.04%). The thin layer chromatography technique was performed to determine the monosaccharide composition in which only glucose was observed. ^{13}C Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was applied to determine the structural aspects of the polysaccharides fractions. NMR spectra suggested the presence of β -glucans (1 \rightarrow 3) and (1 \rightarrow 4) in the ASNaOH and ASW1 fractions and starch (α -glucan) in the ASNaOH fraction. The extraction used was efficient to obtain abundant fractions of β -glucan, which can be used as nutraceutical components.

Key words: NMR- ^{13}C , β -glucans (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4), Cereals polysaccharides, alternative therapy.

INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos vegetais são uma importante fonte de pesquisa para obtenção de novas alternativas para a terapêutica humana e veterinária (Singh et al., 2016). Esses compostos apresentam características fitoquímicas diferentes devido a sua composição e são divididos em metabólitos primários e secundários (Runeckles, 2012). Em relação aos componentes glicídicos (metabólitos primários) presentes em plantas medicinais, vários estudos têm sugerido que as glucanas, pectinas, arabinogalactanas e arabinogalactana-proteínas (AGPs) apresentam potenciais aplicações na medicina (Pettolino et al., 2006). As glucanas são classificadas como α -glucanas ou β -glucanas considerando a configuração do carbono anomérico. Várias aplicações podem ser atribuídas as glucanas (ex. agentes imunomoduladores) (Worku & Morris, 2009).

A aveia (*Avena sativa* L.) é um grão muito utilizado na alimentação dos seres humanos e animais e reconhecidamente apresenta ações terapêuticas devido à presença do polissacarídeo β -glucana em sua parede celular (Arena et al., 2016). Este cereal originário da Europa Ocidental, pertencente à família Poaceae, tem alto teor e qualidade proteica, que varia de 9,7 a 17,3% no grão descascado, é rico em lipídios, que varia de 5,2 a 12,4% e com 13,66 a 30,17 g/100 g de fibra alimentar total, características essas responsáveis por efeitos nutritivos à saúde humana (Sterna et al., 2016).

Entre os carboidratos, a porção amido (α -glucana) com natureza insolúvel em água (25 °C) é o constituinte em maior abundância, com teores médios de 27,3 a 50,01%. As fibras solúveis em água fria presentes em grande concentração são as β -glucanas de 2,70 a 3,50 g/100 g, componentes estruturais da parede celular do grão (Sterna et al., 2016). As β -glucanas são polissacarídeos lineares, compostos por unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4 e β 1 \rightarrow 3 (Mikkelsen et al., 2013). Algumas atividades biológicas dessas moléculas já relatadas são de diminuir o colesterol plasmático total, possuir atividade antioxidante (Alrahmany & Tsopmo, 2012) e antitumoral (Choromanska et al., 2015).

O uso de plantas medicinais nos animais pode ser empregado no tratamento e prevenção de diversas patologias causadas por agentes patogênicos tais como fungos, bactérias, vírus, ecto (Buzatti et al., 2011; Buzatti et al., 2013) e endoparasitos (Sprenger et al., 2015a). Apesar das inúmeras atividades relatadas para espécies vegetais medicinais, como: anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, imunoestimulante e antiparasitária, na prática poucos extratos vegetais e fitoterápicos estão disponíveis na Medicina Veterinária (Sprenger et al., 2015b). As principais razões para isso incluem, principalmente, a falta de conhecimento detalhado da eficácia e a falta de padronização dos extratos vegetais, pois a validade científica de fitoterápicos é uma etapa inicial obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos.

Os testes *in vitro*, usando modelos do sistema complemento, são uma excelente ferramenta para a investigação e avaliação da atividade imunomoduladora de extratos vegetais, constituindo, desta maneira, uma etapa preliminar à caracterização de possíveis compostos ativos (Araújo et al., 2013).

As diferenças em ligação, ramificação de cadeia, peso molecular, e uma solução de conformação contribuem para a mudança entre as atividades biológicas das β -glucanas obtidas das várias fontes disponíveis (como cereais, leveduras e microalgas). Esses carboidratos que já foram relatados com potencial imunomodulador (Murphy et al., 2008). Volman et al., (2010) demonstraram o efeito prebiótico benéfico de dietas com β -glucanas (1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4) obtidas de aveia na dieta de camundongos. Além disso, as β -glucanas foram descritas como altamente fermentáveis pela microbiota intestinal no ceco e no cólon, e relacionadas com o aumento da taxa de crescimento e produção de ácido láctico de micróbios isolados a partir de intestino humano (Kedia et al., 2008). Choromanska et al. (2015) demonstraram em seu estudo, o efeito antitumoral de frações de β -glucanas (1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4) provenientes de aveia sobre células tumorais (*Human Pigmented Malignant Melanoma*), concluindo que esse polissacarídeo tem ótimo potencial terapêutico, por ter forte atividade antitumoral, sem ter apresentado toxicidade. O presente trabalho teve por objetivo testar protocolos de extração e a caracterização fitoquímica de polissacarídeos de aveia-branca.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O material vegetal utilizado, correspondendo aos grãos de aveia-branca secos, descascados (100 g) foi obtido comercialmente (Furuta Produtos Naturais, Curitiba, PR, 25° 25' 47" S 49° 16' 19" O). Este material foi triturado e tamisado em malhas de 1 mm.

Inativação Enzimática

Antes da extração, os grãos foram submetidos ao processo de inativação enzimática adaptado de Harasym et al (2015). Para isso foi utilizada solução hidroalcóolica na proporção 1:6 (H₂O:EtOH 50%). O material foi aquecido à temperatura de 80°C e mantido sob agitação mecânica por 1 h. Após isto, o material foi filtrado em sistema a vácuo (Prismatec 131, Itu, Brasil).

Extrações Aquosas em 25°C e Alcalina

Para a obtenção das frações, o material seco e inativado foi submetido a duas extrações aquosas sequenciais à temperatura ambiente (25°C). As extrações aquosas foram realizadas sob agitação mecânica (modelo EEQ-9034, Edutec, Astral científica, Curitiba, Brasil), utilizando volume padrão (4000 ml) de água destilada durante 1 h. Em seguida, o material foi filtrado em sistema a vácuo (modelo 131, Prismatec, Itu, Brasil). Todos os sobrenadantes obtidos tiveram o volume reduzido utilizando evaporador rotatório (70 °C) e depois precipitados com três vezes o seu volume em etanol e o resíduo gerado seguiu para a extração seguinte. Este procedimento gerou as frações ASW1 e ASW2, correspondendo, respectivamente as frações da 1ª e da 2ª extração aquosa.

A extração alcalina foi realizada utilizando o resíduo da segunda extração aquosa. Apenas uma extração foi realizada, seguindo o protocolo mencionado anteriormente, porém, utilizando uma solução de NaOH 0,1M com pH 8 a 10 (4000 ml à temperatura de 80°C por 2 h. Essa extração gerou a fração ASNaOH.

Todas as frações precipitadas foram separadas do sobrenadante etanólico por centrifugação 4300 rpm/20 min, solubilizadas em água destilada, dialisadas (em membrana de celulose com limite de exclusão de 12-14 KDa) por 24 h, liofilizadas e armazenadas a 4°C até a sua utilização.

Remoção enzimática do amido

A fração ASNaOH foi submetida a remoção enzimática do amido, resultando na fração ASNaOHt. A amostra foi solubilizada na concentração de 10 mg/ml em tampão fosfato 20 mM (45 ml de Na_3PO_4 20 mM + 55 ml de Na_2HPO_4 20 mM), pH 6,9 contendo 0,67 mM de NaCl. Foi utilizada a enzima α -amilase termoestável (Sigma), na concentração de 250 μl de α -amilase por ml de solução de polissacarídeo. A reação foi mantida sob agitação durante 3 h a 55°C. Posteriormente, a enzima foi inativada por fervura durante 15 minutos, o material centrifugado e o resíduo contendo as enzimas desnaturadas foi descartado. O sobrenadante foi precipitado com quatro volumes de etanol e mantido sob refrigeração durante a noite. O material foi centrifugado em seguida e o resíduo lavado com etanol, sendo ressolubilizado e dialisado por 48 h em membrana com limite de exclusão de 12 KDa, congelada e liofilizada.

Dosagens Colorimétricas

Todas as frações polissacarídicas obtidas foram analisadas quanto ao teor de carboidrato total, proteína total e compostos fenólicos. Estas análises consistiram o cálculo de cada porcentagem em relação às curvas analíticas, confeccionadas com padrões correspondentes para cada experimento. As amostras das frações polissacarídicas foram solubilizadas em H_2O e em concentrações específicas para cada experimento. Para os ensaios citados acima, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro de microplacas (EPOCH, BioTek, Winooski, EUA) utilizando microplacas de 96 poços com fundo chato (Techno Plastic, TPP-AG, Trasadingen, CH).

Compostos Fenólicos

Para a determinação dos compostos fenólicos, foi empregado o microensaio adaptado de Singleton & Rossi (1965) o qual utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. Este

reagente consiste em uma solução de íons complexos, formados a partir dos heteropoliácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras, utilizando uma curva padrão constituída por ácido gálico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO - EUA) em concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml. Para este ensaio, 20 µl das amostras foi adicionada em microtubos de 2 ml, em triplicata e em uma concentração de 1 mg/ml e 100 µl do reagente Folin-Ciocalteu a 10 % (Cromato Produtos Químicos, SP, Brasil). A solução foi homogeneizada em agitador de tubos e, subsequentemente, foi adicionado 80 µl de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5 % (m/v). A solução foi agitada novamente e, por fim, os tubos foram aquecidos, em estufa a 50°C durante 5 min. Após o resfriamento, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 760 nm (Biotek, SP, Brasil).

Proteína Total

Para a dosagem do conteúdo de proteína total, foi utilizado o método adaptado de Bradford (1976), que utiliza o corante aniônico Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO - EUA). Este corante pode apresentar dois aspectos diferentes: o primeiro equivale à forma vermelha, que apresenta absorbância máxima em 470 nm e corresponde a forma catiônica do corante; e o segundo denota a conversão do vermelho em azul, gerando a forma aniônica do corante, o qual é capaz de se ligar as proteínas e sua absorbância máxima encontrada em 595 nm (Bradford, 1976).

Para este ensaio, foram adicionados 40 µl das amostras em concentração de 1 mg/ml em triplicata, em microtubos de 2 ml. Em seguida, adicionou-se 40 µl do reagente de proteína e a solução foi homogeneizada em agitador de tubos. A leitura das amostras foi realizada em comprimento de onda de 595 nm. O reagente de proteína consistiu de 40mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, dissolvidos em 20 ml de metanol a 95 %, 40 ml de ácido o-fosfórico e quantidade suficiente de H_2O para completar o volume final de 1000

ml. Para a elaboração da curva padrão, foi utilizada albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) nas concentrações de 4 a 40 µg/ml.

Carboidrato Total

A dosagem dos teores de carboidratos totais foi realizada através do procedimento descrito originalmente por Dubois et al. (1956) e adaptado por Fox & Robyt (1991) em triplicata. Esse microensaio tem como princípio a determinação quantitativa de açúcares simples e seus derivados metilados, oligossacarídeos e polissacarídeos, através da análise por espectrofotometria. Soluções de glucose (Merck, Darmstadt - DE) em concentrações de 4, 8, 16, 24, 32 e 40 µg/ml, foram utilizadas na confecção da curva, utilizada para calcular a porcentagem de carboidratos totais de cada amostra. Para a realização deste teste, um volume de 40 µl de cada uma das amostras (1 mg/ml) foi transferido a microtubos de 2 ml juntamente com 40 µl da solução de fenol a 5 % (m/v). A solução foi homogeneizada em agitador de tubos (modelo QL-901, Vertex, BR) com posterior adição cuidadosa de 200 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Novamente, houve a homogeneização da solução e incubação em estufa 100 °C por 10 min. Após o resfriamento em banho de gelo, a mistura resultante foi transferida para microplacas e analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

Determinação da Composição monossacarídica por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A CCD foi utilizada para determinação qualitativa da composição monossacarídica das frações ASW1 e ASNaOH. A análise foi precedida pela hidrólise total das amostras com ácido trifluoracético (TFA) 2,5 M, por 3 h, a 100 °C. Após evaporação do ácido, as amostras foram ressolubilizadas em H₂O, e em seguida, aplicadas em cromatoplas

Merck 60 F254 recobertas com sílica gel, utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila:n-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1, v/v). A corrida cromatográfica ascendente foi desenvolvida em cuba de vidro previamente saturada com a fase móvel. Após a cromatografia, os açúcares foram visualizados através de borrifamento com solução de orcinol 0,5% (m/v) em etanol/H₂SO₄ e aquecimento a 100°C, até o aparecimento de coloração. Os componentes monossacarídeos presentes foram identificados comparando-se a coloração e fator de retenção (R_f) daquelas observados na solução padrão de glucose.

Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN-¹³C foram obtidos observando-se os núcleos de ¹³C a 400,13 MHz. As amostras foram solubilizadas em D₂O, foram analisadas em tubos de 5 mm a temperatura de 70°C e tiveram seus deslocamentos químicos expressos em ppm. A calibração dos espectros foi realizada utilizando acetona como referência. O espectroscópio utilizado para as análises de RMN foi da marca BRUKER, Modelo DRX 400, série Avance.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dosagens colorimétricas

Os resultados das dosagens colorimétricas estão apresentados na Tabela 1. Todas as frações apresentaram quantidades muito semelhantes de todos os compostos mensurados, sendo que o teor de proteína total e fenóis totais foram insignificantes, o que era esperado devido as condições de extração (Harasym et al., 2015) e composição nutricional dos grãos de aveia (Sterna et al., 2016). As frações apresentaram alto teor de carboidrato total. Considerando que os grãos de aveia são ricos em polissacarídeos como

o amido e as β -glucanas (Castro et al., 2012; Mikkelsen et al., 2013; Arena et al., 2016), confirmando os resultados da espectroscopia de RMN- ^{13}C .

Tabela 1. Dosagens colorimétricas de Carboidrato total, Proteína total e Fenóis totais das frações de Aveia-branca (ASW1, ASW2 e ASNaOH). Todas as frações foram solubilizadas em D_2O , analisadas em tubos de 5 mm a temperatura de 70°C .

Compostos / Frações	ASW1	ASW2	ASNaOH
Carboidrato Total ^a (%)	$67 \pm 15,6$	$66 \pm 8,13$	$99 \pm 3,14$
Proteína Total ^b (%)	$0,25 \pm 0,0006$	$0,25 \pm 0,001$	$0,24 \pm 0,002$
Fenóis Totais ^c (%)	$0,04 \pm 0,07$	$0,04 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,06$

^a $R^2 = 0,996$. Calculado pela curva de glucose (Dubois et al., 1956; Fox & Robyt, 1991).

^b $R^2 = 0,995$. Calculado pela curva com corante Coomassie Brilliant Blue (Bradford, 1976).

^c $R^2 = 0,998$. Calculado pela curva com reagente Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965).

Determinação da Composição Monossacarídica por CCD

O único monossacarídeo detectado na CCD foi a glucose (Figura 1), confirmando a composição dos polissacarídeos presentes nos grãos de aveia. Tanto as β -glucanas, como o amido são polissacarídeos formados por glucose (Castro et al., 2012; Mikkelsen et al., 2013; Arena et al., 2016). Sterna et al. (2016) utilizando o *Infratec Analyser 1241* determinaram a composição química de grãos de aveia, encontrando também β -glucanas e amido, em aproximadamente 2 e 80% da composição total; corroborando os resultados do presente trabalho.

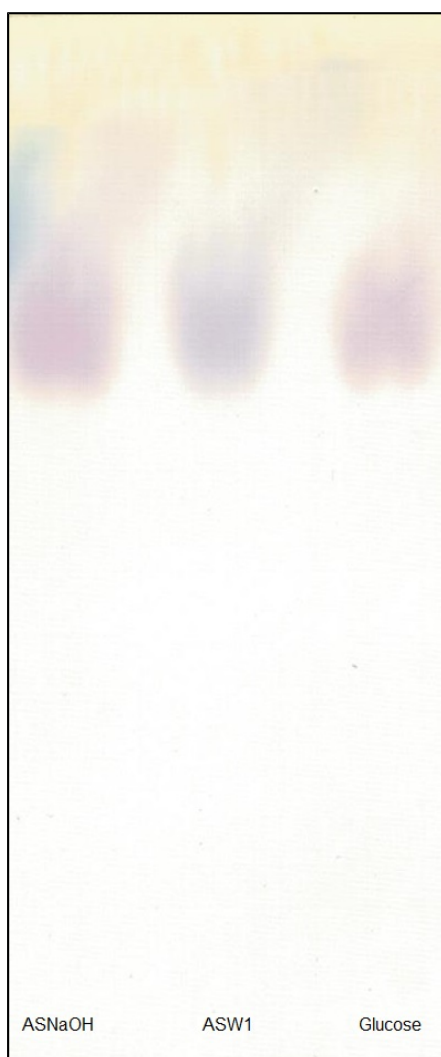


Figura 1. Perfil monossacarídico obtido em Cromatografia por Camada Delgada das frações ASW1 e ASNaOH. As amostras testadas foram previamente hidrolisadas com TFA 2,5 M por 3 h a 100°C. A corrida cromatográfica ascendente foi realizada utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila:n-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v). A visualização dos açúcares foi possível após borrifamento com solução de orcinol 0,5% (m/v) em etanol/H₂SO₄ e aquecimento a 100 °C. O padrão utilizado foi glucose (com R_f 0,69). As frações ASNaOH e ASW1 apresentaram R_f de 0,7 e 0,69, respectivamente.

Análises de espectroscopia de RMN-¹³C das frações ASW1 e ASNaOH

O espectro de RMN-¹³C da fração ASW1 (Figura 2) na região do carbono anomérico apresentou dois assinalamentos: δ 102,612 e 102,347, atribuídos ao C1 de β -glucanas (1 \rightarrow 3) (Saitô et al., 1977; Dais & Perlin, 1982; Kogan et al., 1988) e β -glucanas (1 \rightarrow 4) (Dais & Perlin, 1982; Ghotra et al., 2008) respectivamente. A fração ASNaOH (Figura 3) apresentou três assinalamentos na região do carbono anomérico: δ 102,645 referente ao C1 de β -glucanas (1 \rightarrow 3) (Saitô et al., 1977; Dais & Perlin, 1982; Kogan et al.,

1988), δ 102,358 referente ao C1 de β -glucanas (1 \rightarrow 4) (Dais & Perlin, 1982; Ghotra et al., 2008) e δ 99,922 referente ao C1 do amido (α 1 \rightarrow 4) (Dais & Perlin, 1982; Choi et al., 1999; Lenzi et al., 2011). Ambas as frações apresentaram assinalamentos em δ 84 atribuído ao C3 e sinais em δ 69,671 (ASNaOH) e 68,224 (ASW1) referentes ao C4 ambos de β -glucanas (1 \rightarrow 3) (Saitô et al., 1977; Dais & Perlin, 1982; Kogan et al., 1988) (Tabela 2). As duas frações também apresentaram assinalamentos em δ 78 referentes ao C4 de β -glucanas (1 \rightarrow 4) (Dais & Perlin, 1982; Ghotra et al., 2008) e na fração ASNaOH também foi observado assinalamento em δ 77,824 relacionado com o C4 do amido (amilose e amilopectina) (Dais & Perlin, 1982; Choi et al., 1999; Lenzi et al., 2011). A fração ASW1 apresentou duplo assinalamento na região de carbono 6 livre relacionados aos C6 das β -glucanas (1 \rightarrow 3) (Saitô et al., 1977; Dais & Perlin, 1982; Kogan et al., 1988) e (1 \rightarrow 4) (Dais & Perlin, 1982; Ghotra et al., 2008). O espectro da fração ASNaOH apresentou pico em δ 60,753 referente ao C6 do amido (Dais & Perlin, 1982; Choi et al., 1999; Lenzi et al., 2011), além dos assinalamentos relacionados com as β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) que também foram observados (Dais & Perlin, 1982). A fração ASW1 apresentou além dos assinalamentos supracitados, picos de δ 75,750 e 72,954 que estão intimamente relacionados com os carbonos 2 e 5 das β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) (Saitô et al., 1977; Dais & Perlin, 1982; Kogan et al., 1988; Silveira et al., 2014) (Tabela 2).

A fração ASNaOH também apresentou diversos assinalamentos que vão de δ 75,759 – 71,482 e estão relacionados com os carbonos 2 e 5 das β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) e do amido (Dais & Perlin, 1982) (Tabela 2). O espectro ASW1 apresentou um total de 14 picos de assinalamento o que confirma a presença de dois compostos formados por glucose, no caso as β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) que totalizariam 12 picos de carbono. Estes dois sinais não identificados podem estar relacionados com resíduos monossacarídicos na fração. O espectro da fração ASNaOH apresentou 14 picos de assinalamento o que corrobora a presença de três compostos baseados em glucose

(amido, β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4), nessa fração os carbonos 1, 2, 4 e 6 dos três carboidratos foram identificados e o C3 da β -glucana (1 \rightarrow 3) também foi identificado. A presença de amido como contaminante na fração ASNaOH pode estar relacionada a sua maior solubilidade em extrações quentes (acima de 60 °C) do que sob temperatura ambiente (25°C) (Mikkelsen et al., 2013), esse sendo o motivo da fração ASW1 ser livre de amido devido à realização de extração aquosa fria.

Potter et al. (2002) realizaram extração aquosa fria com farelo de aveia moído e descreveram que este é um método eficaz para purificação e obtenção de extratos de β -glucanas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4), além de afirmar que a contaminação por amido é um dos problemas nas extrações alcalinas quentes, sendo a utilização de enzimas (α -amilases, liquenases) uma alternativa para purificação. Não foi realizado o espectro de RMN- ^{13}C da fração ASW2 devido ao seu baixo rendimento. O espectro de RMN- ^{13}C da fração ASNaOH foi comparado ao da fração ASNaOht que não apresentou os picos correspondentes do amido, demonstrando que a remoção enzimática foi eficaz.

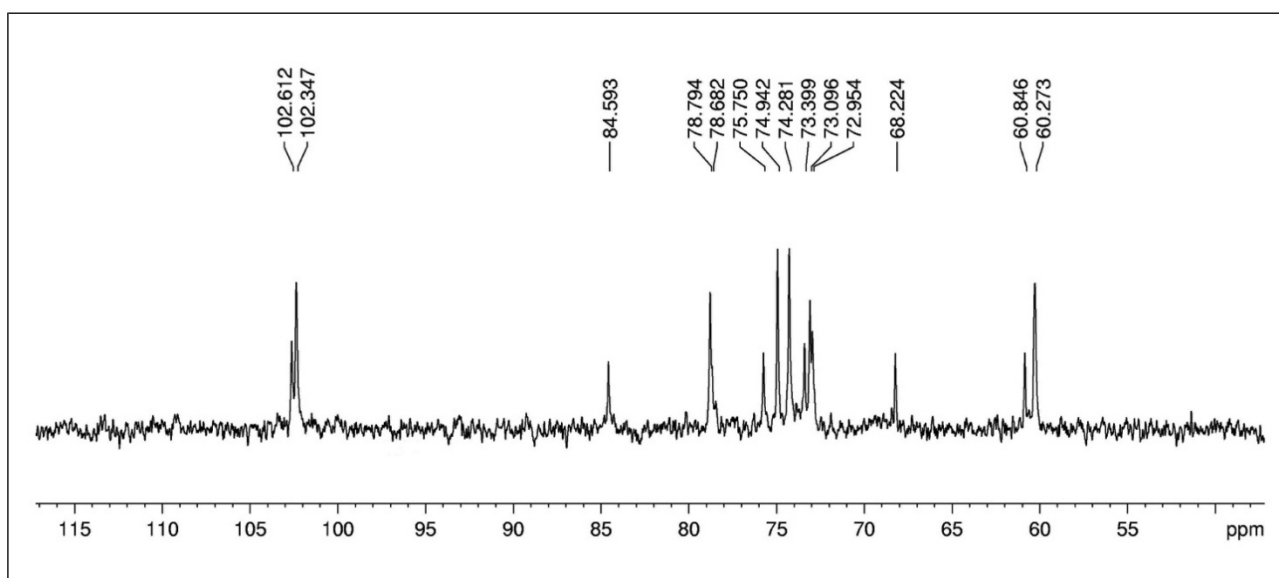


Figura 2. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C da Fração ASW1 (extração aquosa). Amostras solubilizadas em D_2O , analisadas em tubos de 5 mm a temperatura de 70°C. Deslocamentos químicos expressos em δ ppm. A calibração dos espectros foi realizada utilizando acetona como referência externa.

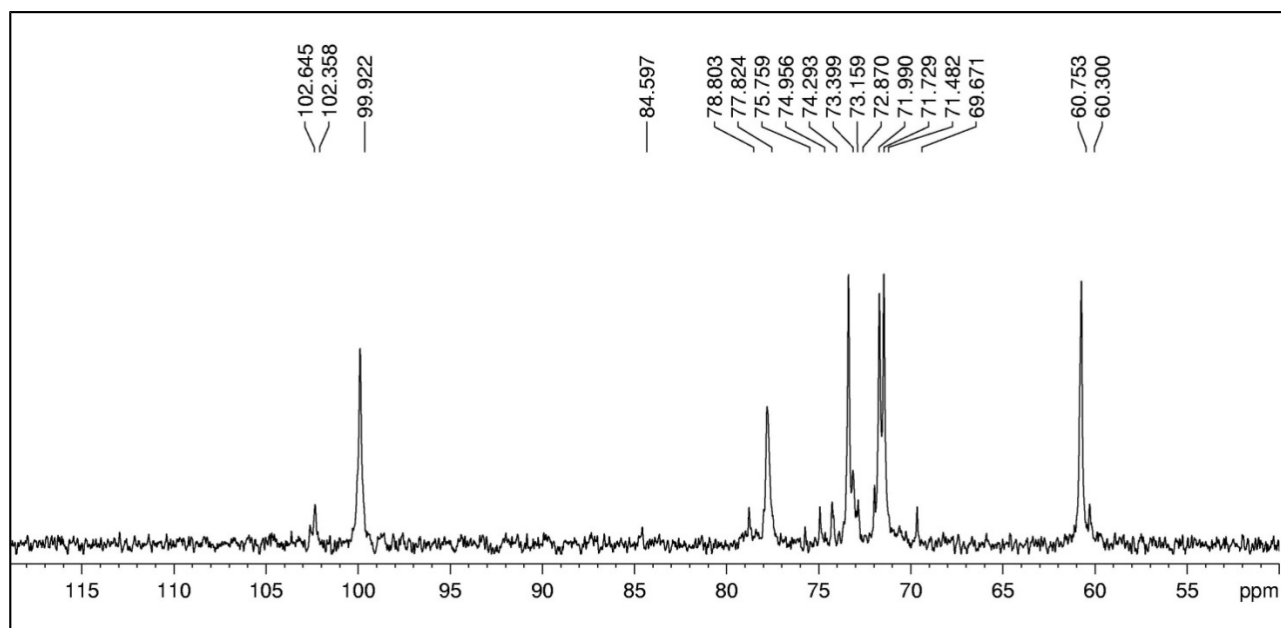


Figura 3. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C da Fração ASNaOH (extração alcalina com NaOH). Amostras solubilizadas em D_2O , analisadas em tubos de 5 mm a temperatura de 70°C . Deslocamentos químicos expressos em δ ppm. A calibração dos espectros foi realizada utilizando acetona como referência externa.

Tabela 2. Assinalamentos de RMN- ^{13}C das frações extrações aquosa e alcalina, respectivamente ASW1 e ASNaOH.

	ASNaOH			ASW1	
	β -glucanas (1 \rightarrow 3)	β -glucanas (1 \rightarrow 4)	α -glucana ^c (1 \rightarrow 4)	β -glucanas (1 \rightarrow 3)	β -glucanas (1 \rightarrow 4)
C1	102,645	102,358	99,922	102,612	102,347
C2	a	A	a	a	a
C3	84,597	B	b	84,593	b
C4	69,671	78,803	77,824	68,224	78,794
C5	a	A	a	a	a
C6	60,753	60,300	60,753	60,846	60,275

^a 75,759 – 71,482 Carbonos não definidos, mas presentes na região de C2-C5.

^b 74,956 - 72,870 Carbonos não definidos, mas presentes e relacionados à C3 de amido e β (1 \rightarrow 4).

^c Amilose e amilopectina (amido).

O uso de β -glucanas na terapia para humanos e animais tem grandes potencialidades para se obter novas aplicações (ex: novo imunestimulante) de utilidade pública e médica/nutricional. Com os resultados da caracterização e padronização da extração de β -glucanas de aveia obtidos nesse trabalho, torna-se oportuna a realização

de testes de atividade biológica, como ensaios para avaliar atividades do Sistema Complemento. Estudos prévios indicam que esses compostos apresentam potencial terapêutico, como Alrahmany & Tsopmo (2012) ao avaliarem frações de farelo de aveia, observaram o aumento de 50% da propriedade antioxidante após a utilização desse produto. Choromanska et al. (2015) demonstraram o efeito antitumoral (diminuição de 51%) de frações de β -glucanas (1-3, 1-4) provenientes de aveia sobre células tumorais (*Human Pigmented Malignant Melanoma*), onde concluíram que esse polissacarídeo apresentou ótimo potencial terapêutico e de segurança.

CONCLUSÃO

Os polissacarídeos foram os compostos encontrados em maior quantidade nos grãos de aveia, ressaltando a importância principalmente das β -glucanas (1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4). Neste trabalho, observou-se que a extração aquosa em temperatura ambiente foi uma adequada fonte para purificação de β -glucanas por não haver contaminação de amido na fração obtida, sendo uma alternativa ao uso de tratamento enzimático (α -amilase) para purificação do extrato de β -glucanas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Arquimedes Paixão de Santana Filho, responsável técnico do RMN do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pela análise das amostras e a Raquely Moreira Lenzi, do Programa de Pós-graduação Ciências - Bioquímica pelo apoio técnico e auxílio no tratamento enzimático das frações.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. M. M. et al. Ativação in vitro do sistema complemento como mecanismo imunomodulador induzido pelo mesocarpo de babaçu. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, 2013.
- ALRAHMANY, R; TSOPMO, A. Role of carbohydrases on the release of reducing sugar, total phenolics and on antioxidant properties of oat bran. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 413-418, 2012.
- ARENA, M. P.; RUSSO, P.; FIOCCO, D.; CAPOZZI, V.; SPANO, G. β -glucans and Synbiotic Foods. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. (Org.). **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion**. Londres: Academic Press, 2016. cap. 28, p. 423-430.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUZATTI, A. et al. Ação do óleo de nim frente à teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em testes *in vitro*. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 07-12, 2013.
- BUZATTI, A. et al. Acaricide activity in vitro of *Glechon spathulata* Benth. On engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1813-1817, 2011.
- CASTRO, G.S.A.; COSTA, C.H.M.; NETO, J.F. Ecofisiologia da aveia branca. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 3, p. 1-15, 2012.
- CHOI, E.J.; KIM, C.H.; PARK, J.K. Synthesis and characterization of starch-g-polycaprolactone copolymer. **Macromolecules**, v. 32, n. 22, p. 7402-7408, 1999.

- CHOROMANSKA, A. et al. Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan—An in vitro study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 23-28, 2015.
- DAIS, P; PERLIN, A.S. High-field, ^{13}C -NMR spectroscopy of β -D-glucans, amylopectin, and glycogen. **Carbohydrate Research**, v. 100, n. 1, p. 103-116, 1982.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FOX, J.D.; ROBYT, J.F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 195, n. 1, p. 93-96, 1991.
- GHOTRA, B. S.; VASANTHAN, T.; TEMELLI, F. Structural characterization of barley β -glucan extracted using a novel fractionation technique. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 957-963, 2008.
- HARASYM, J.; SUCHECKA, D.; GROMADZKA-OSTROWSKA, J. Effect of raw material size reduction by freeze-milling on beta-glucan recovery process from oat bran. **Journal of Cereal Science**, v. 61, n. 11, 2015.
- KEDIA, G.; VÁZQUEZ, J.A.; PANDIELLA, S.S. Evaluation of the fermentability of oat fractions obtained by debranning using lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 4, p. 1227-1237, 2008.
- KOGAN, G; ALFÖLDI, J; MASLER, L. ^{13}C -nmr spectroscopic investigation of two yeast cell wall β -D-glucans. **Biopolymers**, v. 27, n. 7, p. 1055-1063, 1988.
- LENZI, R. M. et al. Effects of aqueous fractions of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC on macrophage modulatory activities. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 767-779, 2013.

- MIKKELSEN, M.S. et al. Molecular structure of large-scale extracted β -glucan from barley and oat: identification of a significantly changed block structure in a high β -glucan barley mutant. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 130-138, 2013.
- MURPHY, E. A. et al. Benefits of oat β -glucan on respiratory infection following exercise stress: role of lung macrophages. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 5, p. R1593-R1599, 2008.
- PETTOLINO, F. et al. Structure, function and cloning of arabinogalactan-proteins (AGPs): an overview. **Foods and Food Ingredients Journal of Japan**, v. 211, n. 1, p. 12, 2006.
- POTTER, R.C. et al. **Polysaccharide compositions and uses thereof**. U.S. Patent n. 6,485,945, 26 nov. 2002.
- RUNECKLES, V. C. **Recent advances in phytochemistry: proceedings of the ninth annual symposium of the Phytochemical Society of North America**. 9. ed. Indiana, EUA, 2012. 317 p.
- SAITÔ, H. et al. A ^{13}C -NMR-Spectral study of a gel-forming, branched (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight. **Carbohydrate Research**, v. 58, n. 2, p. 293-305, 1977.
- SILVEIRA, M.L.L. et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear β -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor* - caju. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 588-596, 2014.
- SINGH, P. et al. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, 2016.

- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SPRENGER, L.K. et al. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre parasitas gastrintestinais de bovinos. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 25-31, 2015a.
- SPRENGER, L.K. et al. Efeito anticoccidiano de extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* em camas de aves contaminadas com *Eimeria* sp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 649-651, 2015b.
- STERNA, V; ZUTE, S; BRUNAVA, L. Oat Grain Composition and its Nutrition Benefice. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 8, p. 252-256, 2016.
- VOLMAN, J.J. et al. Dietary (1→ 3), (1→ 4)-β-d-glucans from oat activate nuclear factor-κB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 40-48, 2010.
- WORKU, M; MORRIS, A. Binding of different forms of lipopolysaccharide and gene expression in bovine blood neutrophils. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3185-3193, 2009.

3. CAPÍTULO 3: Efeito modulador de polissacarídeos da aveia-branca (*Avena sativa* L.) sobre a via clássica do sistema complemento humano

Artigo a ser submetido na Revista Brasileira de Plantas Medicinais

Efeito modulador de polissacarídeos da aveia-branca (*Avena sativa* L.) sobre a via clássica do sistema complemento humano

VIEIRA, D.L.^{1*}; MAURER, J.B.B.²; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.²; LENZI, R.M.², YAMASSAKI, F.T.²; MOLENTO, M.B.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, 80035050 Curitiba – PR, Brasil. ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, 81531990 Curitiba – PR, Brasil. * Autor para correspondência.

RESUMO: Desde sua descoberta há mais de um século, a cascata do sistema complemento tem sido considerada uma importante ferramenta da imunidade inata. A ativação desse sistema ocorre na superfície celular do alvo, e iniciam-se pela ligação de uma ou mais moléculas de uma de suas vias, alternativa, clássica ou das lectinas. A via clássica destrói alvos ligados com anticorpos, células apoptóticas, bactérias gram-negativas e alguns vírus. A via das lectinas ligada à manose destrói patógenos portadores de manose. O presente trabalho teve por objetivo determinar a resposta de frações de aveia (ASNaOHt e ASNaOH) sobre a via clássica do sistema complemento humano a partir de ensaios hemolíticos e a diferença entre essas frações e os controles inibitório (Heparina suína) e ativador (zimozam). As frações ASNaOHt, ASNaOH e zimozam não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em ambos os ensaios (sem e com pré-incubação). No entanto, a fração de ASNaOHt apresentou ICH_{50} relativamente menor, o que indica que o potencial dose-resposta dessa fração ($11,40 \mu\text{g/ml}$ no teste com pré-incubação) é maior que o apresentado pelas outras, pois uma dose menor apresenta o mesmo efeito. Em relação com a fração heparina, as demais frações apresentaram-se iguais no ensaio sem pré-incubação e mais eficazes no ensaio com pré-incubação, o que indica que essas amostras, a partir da via clássica, são capazes de ativar o sistema complemento, e não de inibi-lo, como a heparina. No presente estudo demonstrou-se a capacidade das β -glucanas obtidas de aveia em agir como ativadoras da via clássica do sistema complemento, e com isso apresentando-se como uma importante fonte na utilização da saúde animal e humana.

Palavras-chave: β -glucanas (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4), Amido, Polissacarídeos de cereais, Terapia alternativa.

ABSTRACT: Since its discovery more than a century ago, the complement system has been considered an important tool to understand the innate immunity. Activation of this system occurs at a target cell surface, and is initiated by the binding of one or more

molecules from its alternative, classical, or lectin pathways. The aim of the present work was to determine the response of oat fractions (β -glucan 1 \rightarrow 3 and 1 \rightarrow 4 and starch) on the classical pathway of the human complement system using hemolytic assays, determining the differences between these fractions and the inhibitory controls (Swine heparin) and activator (zymozan). The β -glucans, starch and zymozan fractions did not show any significant difference ($P>0.05$) in both assays (without and with pre-incubation). However, the β -glucans fraction had a relatively lower ICH_{50} (11,40 μ g/ml with pre-incubation) which indicates that the potential dose-response of this fraction was higher than that presented by the others. This may be due to the lower dose of β -glucans fraction, which had the same effect when compared to the starch fraction. In relation to the heparin fraction, the other fractions had similar results, as in the assay without preincubation, and were more effective in the pre-incubation assay, indicating that these samples are able to activating the classical pathway. The present study demonstrated the ability of β -glucans as activators of the classical pathway of the complement system, and thus present an important tool to be use in animal and human immune therapy.

Key words: β -glucans (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4), Starch, Cereals polysaccharides, alternative therapy.

INTRODUÇÃO

Desde sua descoberta há mais de um século, a cascata do sistema complemento tem sido considerada uma importante ferramenta ao entendimento da imunidade inata contra agressões externas. Um conjunto de 12 proteínas solúveis que tem a capacidade de desencadear a lise celular (resposta citolítica) na ausência de outros elementos imunológicos; tanto humorais como celulares (Rutkowski et al., 2010). A ativação desse sistema ocorre na superfície da célula alvo, e iniciam-se pela ligação de uma ou mais moléculas de uma de suas vias; alternativa, clássica ou das lectinas (Kemper e Atkinson, 2007; Rutkowski et al., 2010). A via clássica destrói alvos ligados (vírus, protozoários, células diferenciadas) a anticorpos. A via das lectinas ligada à manose destrói patógenos portadores de manose. Por último, a via alternativa destrói uma variedade de agentes infecciosos, incluindo bactérias, vírus e fungos, além de desempenhar um papel na vigilância imunológica dos tumores (Walport, 2001; Rutkowski et al., 2010). A sua junção em uma via comum final, resulta na criação do complexo de ataque a membrana (MAC: do inglês: *membrane attack complex*), uma estrutura que forma poros anfipáticos e é

composta por C5b, C6, C7, C8 e múltiplas moléculas de C9 (Cole e Morgan, 2003; Rutkowski et al., 2010). A conservação e evolução do sistema complemento ao longo do desenvolvimento evolutivo demonstram o seu importante papel na defesa do hospedeiro, primeiramente de vertebrados (Morgan, 1995).

Os polissacarídeos vegetais são considerados potentes substâncias imunomoduladoras e demonstraram-se eficazes como terapêuticos, especialmente devido à sua capacidade de modulação do sistema complemento (Bovo et al, 2016). Estudos experimentais e clínicos demonstraram que polissacarídeos derivados de plantas e fungos exibem uma série de propriedades terapêuticas benéficas, incluindo imunoestimulação.

Tzianabos (2000) relata em seu trabalho que β -glucanas influenciam a imunidade inata e mediada por células através de interações com células T, monócitos, macrófagos e linfócitos polimorfonucleares e essa capacidade de modular a resposta imunitária de uma forma apropriada pode aumentar a resposta imunitária do hospedeiro a certas infecções.

A atividade antitumoral de β -glucanas também já foi relatada como nos trabalhos de Sergeev et al. (1985) que avaliaram essas moléculas sobre células de Sarcoma de Crocker em camundongos Balb/C, onde foi observada redução de 30% das células tumorais. Atualmente, polissacarídeos de plantas também são usados em oncologia clínica para aumentar a eficácia de preparações quimioterápicas e reduzir seus efeitos colaterais (Schepetkin e Quinn, 2006). Choromanska et al. (2015) demonstraram o efeito antitumoral (diminuição de 51%) de frações de β -glucanas (1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4) provenientes de aveia sobre células tumorais (*Human Pigmented Malignant Melanoma*), onde concluíram que esse polissacarídeo apresentou ótimo potencial terapêutico e de segurança.

As glucanas são conhecidas por apresentar efeito sobre o sistema imunológico. Principalmente as β 1 \rightarrow 3 glucanas com certo grau de ramificação em C6 (Paulsen, 2001). Esse polissacarídeo que ocorre particularmente na aveia (*A. sativa* L.) e na cevada (*Hordeum vulgare* L.), representa a maioria dos benefícios clínicos observados com as

fibras dietéticas. Os benefícios nutricionais mais amplamente documentados da β -glucana nos alimentos são a redução dos níveis séricos de colesterol ($\cong 50\%$) descrito por Mikkelsen et al. (2013). Além da atividade imunomoduladora, pois atuam nos animais estimulando as células fagocíticas (Zaine, 2010).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório das frações de aveia (β -glucana 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4 e amido) sobre a via clássica do sistema complemento humano, utilizando ensaios hemolíticos e também determinar a diferença entre essas frações e um controle inibitório (Heparina suína) e um ativador (Zimozam).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foi utilizado β -glucana (ASNaOHt) e amido (ASNaOH) obtidos à partir de extração alcalina (NaOH 0,1M com pH 8 a 10 por 2h, 80 °C) de grãos de aveia-branca (*Avena sativa* L.) secos descascados obtidos comercialmente (Furuta Produtos Naturais – Curitiba, PR, 25° 25' 47" S 49° 16' 19" O).

Preparo das frações

As frações de ASNaOHt e ASNaOH foram diluídas por 24h em tampão HEPES-NaCl (HEPES (Sigma-Aldrich) 50 mM, NaCl 750 mM, suplementados com CaCl_2 (Sigma-Aldrich) 0,25 mM e MgCl_2 (Sigma-Aldrich) 0,8mM) em uma concentração de 5 mg/ml e posteriormente filtradas em membrana de 0,22 μm . As diluições seriadas foram realizadas para obter concentrações de 416,67; 208,33; 104,17; 52,08; 26,04; 13,02; 6,51 e 3,26 $\mu\text{g/ml}$.

Controles de inibição e ativação

Foram utilizados os controles Heparina suína (Sigma-Aldrich, USA) e Zimozam (Sigma-Aldrich) como controles de inibição e ativação da via clássica do Sistema Complemento, respectivamente (Alban et al., 2002). Ambas as soluções foram utilizadas nas concentrações 416,67; 208,33; 104,17; 52,08; 26,04; 13,02; 6,51 e 3,26 µg/ml.

Preparo da Papa de Eritrócitos

Foi utilizado sangue de carneiro obtido comercialmente (Newprov, Pinhais, PR). O sangue foi lavado com solução de NaCl 0,09% duas vezes e uma vez em tampão HEPES-NaCl, em centrifugação de 1440 G por 5 min. Após a última centrifugação a papa de eritrócitos foi ressuspensa em tampão HEPES-NaCl (2,4% v/v) e sensibilizada com um volume igual de hemolisina (anticorpos anti-eritrócitos de carneiro) numa concentração de 1:1500 por 30min em estufa 37 °C.

Teste hemolítico das frações

Foram realizados testes para determinar se as amostras promoviam hemólise dos eritrócitos de carneiro. Para isso foi realizado um pré-teste ao ensaio hemolítico do sistema complemento, onde foram utilizadas somente as frações (β-glucana, amido, heparina e zimozam) em todas as concentrações (20 µl) + tampão HEPES-NaCl (no lugar do soro, 50 µl) e eritrócitos de carneiro (50 µl de papa).

Preparo do soro humano

Utilizou-se soro humano (sangue O+) de onze voluntários, que apresentavam bom estado de saúde, como fonte de complemento. Foi coletado sangue venoso, e separou-se o soro por centrifugação (1440 G por 20 min), armazenando em freezer -80°C até sua

utilização. O título do soro foi determinado por 50% de hemólise de eritrócitos de carneiro. Foi utilizada a diluição de 1:70. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná, Processo nº: CEP 1739.156/2008-08.

Teste Hemolítico de Fixação do Sistema Complemento

Para os ensaios sem pré-incubação (Figura 1), foi adicionado 20 µl da solução de cada uma das frações (ASNaOHt e ASNaOH) ou dos controles (zimozam e heparina suína); 50 µl da solução de papa de eritrócitos sensibilizada; e 50 µl de soro (1:70). Após incubação durante 30 min a 37°C, as amostras foram centrifugadas a 1440 G durante 5 min à temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para placas de 96 poços de fundo plano. Para os ensaios com pré-incubação de 30 min (Figura 1), foi adicionado 20 µl de solução de cada uma das frações (ASNaOHt e ASNaOH) e dos controles (zimozam e heparina suína); e 50 µl de soro (1:70) e incubados por 30 min a 37 °C. Em seguida foi adicionado 50 µl de solução de papa de eritrócitos sensibilizada e incubados novamente por 30 min a 37°C. Posteriormente, foi realizada a centrifugação com 1440 G por 5 min, os sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços de fundo amplo. O grau de hemólise de ambos os testes foi determinado a 405 nm de absorbância em leitor de microplacas (Biotek, SP).

A avaliação de compostos naturais com o sistema complemento foi realizada a partir do ensaio hemolítico do complemento para a via clássica, comparando testes com pré-incubação (30 min) e sem pré-incubação (Alban et al., 2002). Os valores da ICH_{50} calculados correspondem à concentração final das frações-teste (µg/ml) capazes de reduzir a atividade hemolítica da mistura de soro humano em 50%.

Controles experimentais

Em todos os experimentos foram realizados os controles de hemólise total (H₂O), 0% de hemólise do soro, 100% de hemólise do soro e os brancos do soro. Os controles estão apresentados detalhadamente na Tabela 1.

Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos com a média e o desvio padrão. A relação da concentração das frações com a resposta da atividade da via clássica do sistema complemento foi avaliada utilizando a análise de variância unifatorial (One-way ANOVA). O teste de Dunn foi utilizado para determinar a diferença estatística ($P < 0,05$). Também foram calculadas as Concentrações de Inibição de Hemólise de 50% (ICH₅₀ do inglês: *Inhibitory Concentration of Hemolysis*) das amostras. Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do Software GraphPad Prism 7.0.

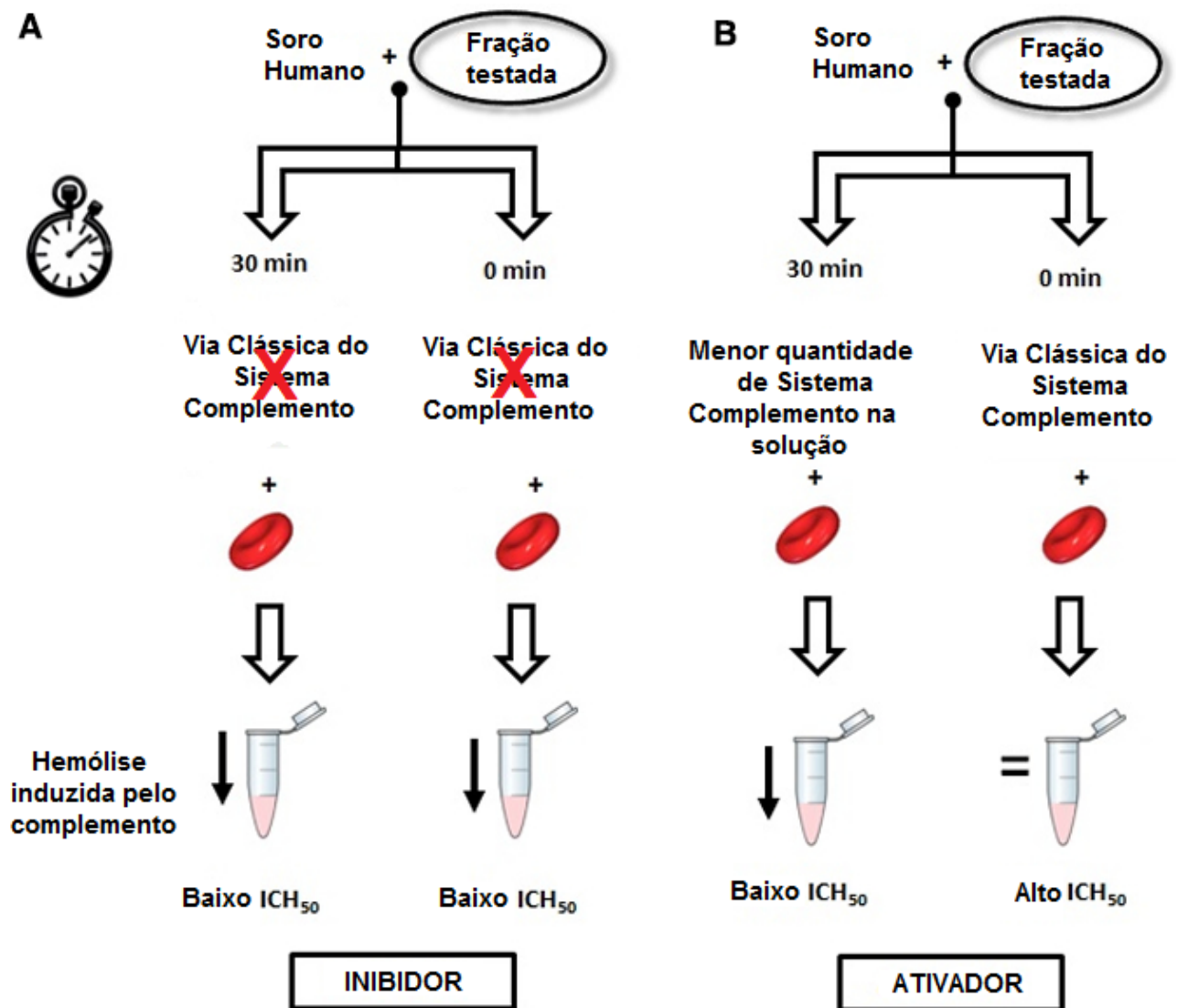


Figura 1. Explicação esquemática da Inibição (A) ou ativação (B) da Via Clássica do Sistema Complemento utilizando ensaios hemolíticos. (A) A inibição ocorre quando uma fração testada impede a ativação do Sistema Complemento, e neste caso, os valores de ICH₅₀ obtidos são semelhantes, independentemente do tempo de incubação. (B) A ativação ocorre quando as frações testadas desencadeiam a cascata (Via clássica), consumindo os componentes do Sistema Complemento na solução. Assim, após 30 min de incubação, apenas uma pequena quantidade de compostos do complemento continua a ser ativada pelos eritrócitos sensibilizados. Uma vez que a ativação demora um certo tempo a ser mantida, os valores da ICH₅₀ obtidos são diferentes dependendo do tempo de incubação. ICH₅₀: Concentração inibitória de Hemólise 50%. Fonte: Adaptado de Bovo et al., 2016.

Tabela 1. Controles hemólise total, 0% de hemólise, 100% de hemólise e branco do soro, utilizados nos experimentos de ativação da via clássica do sistema complemento humano.

Controles	Descrição
Hemólise total (H₂O)	50 µl de papa de eritrócitos + 70 µl de H ₂ O
0% hemólise	50 µl de papa de eritrócitos + 20 µl de tampão* + 50 µl de soro humano inativado**
100% hemólise	50 µl de papa de eritrócitos + 20 µl de tampão* + 50 µl de soro humano
Branco do soro humano	70 µl de tampão* + 50 µl de soro humano

*Tampão HEPES-NaCl (HEPES 50 mM, NaCl 750 mM, suplementados com CaCl₂ 0,25 mM e MgCl₂ 0,8mM). **Inativado em banho-maria 45 °C por 15min.

RESULTADOS

No teste hemolítico das frações ambas as frações ASNaOHt e ASNaOH apresentaram baixa taxa de hemólise (no máximo 5%) e, portanto, se demonstrando aptas para realização dos testes seguintes (ensaio hemolíticos com e sem pré-incubação). O rendimento total de β -glucanas obtidas na extração alcalina (NaOH 0,1M com pH 8 a 10 por 2h, 80 °C) de grãos de aveia-branca foi de 2%.

No presente estudo as frações ASNaOHt e ASNaOH, e os controles zimozam e heparina suína apresentaram respectivamente as seguintes ICH₅₀ no ensaio com pré-incubação: 11,40; 2357,37; 623,51 e 1,06 µg/ml. Os valores de ICH₅₀ das frações ASNaOHt e ASNaOH e do controle ativador zimozam no ensaio sem pré-incubação não foram determinados devido à alta resposta ativadora da via clássica desencadeada por essas frações (Tabela 2). O valor de ICH₅₀ do controle inibidor heparina suína no ensaio sem pré-incubação foi de 5,08 µg/ml.

Comparando os resultados das frações ASNaOHt (11,40 µg/ml) e ASNaOH (2357,37 µg/ml) no ensaio com pré-incubação, percebeu-se a maior eficácia da ASNaOHt como ativadora da via clássica do sistema complemento, principalmente por essa fração ter sido mais pura e ter apresentado uma maior quantidade desses polissacarídeos (β -

glucana 1→3 e 1→4) (Tabela 2). Ao contrário, a fração ASNaOH apresentou apenas aproximadamente 1% de β -glucanas, constituída quase em sua totalidade por α -glucanas (1,4 e 1,6), polissacarídeo esse que não apresentou efeito inibidor e nem ativador da via clássica do sistema complemento, fato esse que pode ter determinado o valor de IC_{50} mais elevado, pois é necessária uma concentração maior dessa fração para apresentar o mesmo efeito. Todas as frações avaliadas nesses ensaios apresentaram capacidade de inibir a hemólise de forma dose-dependente (Figura 2). Em comparação o controle heparina suína, as demais frações apresentaram-se iguais no ensaio com pré-incubação e mais eficazes no ensaio sem pré-incubação, o que indica que essas amostras, a partir da via clássica, são capazes de ativar o sistema complemento, e não de inibi-lo, como a heparina.

Tabela 2. Valores de concentração da fração necessária para inibir 50% da hemólise (ICH_{50}) induzida pela via clássica do sistema complemento.

Frações	ICH_{50}	
	Sem pré-incubação	Com pré-incubação
ASNaOHt	não determinada	11,40 $\mu\text{g/ml}$
ASNaOH	não determinada	2357 $\mu\text{g/ml}$
Heparina	5,08 $\mu\text{g/ml}$	1,06 $\mu\text{g/ml}$
Zimozam	não determinada	623,51 $\mu\text{g/ml}$

As frações ASNaOHt, ASNaOH e o controle zimozam apresentaram maior taxa de indução de hemólise (de $\cong 200$ até $\cong 400\%$ maior) (Figura 2) do que o controle heparina no ensaio sem pré-incubação. Esses dados reafirmam com o fato desses polissacarídeos serem ativadores da via clássica do sistema complemento. Resultados semelhantes também foram obtidos para arabinogalactana-proteínas de *Echinacea purpurea* testada por Alban et al. (2002) e por Bovo et al. (2016) que testaram frações de arabinogalactanas de goma arábica e cajueiro.

DISCUSSÃO

Suzuki et al. (1992) em trabalho utilizando β -glucanas (1-3) (5 mg/ml) obtidas de dois fungos comestíveis (*Grifola frondosa* Gray e *Schizophyllum commune* Fries) também demonstraram o potencial ativador da via clássica do sistema complemento. Neste experimento, a atividade foi determinada por espectrofotometria com absorbância de 280 nm, calculando o percentual de hemólise das frações. Em trabalho experimental realizado com salmões (*Salmon salar* L.), Engstad et al. (1992) determinaram β -glucanas (1-3, 1-6 ligadas) obtidas de *Saccharomyces cerevisiae*, como moduladoras do sistema complemento e consequentemente associadas a melhorias da resposta imune dos salmões e a resistência dessa espécie contra patógenos (bactérias presentes no ambiente marinho).

Bagni et al. (2000) investigaram o efeito da combinação de β -glucanas, α -tocoferol e ácido ascórbico na dieta, sobre a resposta imune inata de badejos cultivados (*Dicentrarchus labrax*). Após 5 semanas de adaptação numa dieta comercial contendo 100 ppm ácido ascórbico e 200 ppm de α -tocoferol, os badejos mudaram para uma dieta suplementada com 2% de β -glucanas (1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 6), ácido ascórbico e α -tocoferol a 500 ppm. A dieta suplementada foi administrada a 2% do peso corporal 1 vez por dia, durante 2 semanas, a cada 3 meses. A concentração plasmática de lisozima, o conteúdo e a distribuição das principais proteínas plasmáticas e a atividade do sistema complemento foram medidos antes da alimentação da dieta suplementada e após 40 semanas. A ativação da via alternativa do sistema complemento e a atividade da lisozima foram significativamente ($P < 0,05$) melhores nos badejos alimentadas com β -glucanas, dados esses que demonstram a eficiência da utilização de β -glucanas na suplementação da dieta animal.

Hamuro et al. (1978) desenvolveram estudo utilizando β -glucanas (1 \rightarrow 3) obtidas do fungo comestível *Wolfiporia extensa* Ginns e observaram que esses polissacarídeos apresentaram efeito ativador do sistema complemento (via alternativa), além de atividade antitumoral sobre o sarcoma 180, com taxas de inibição tumoral de 61 até 100%. Trabalhos como esses demonstram a importância da utilização de β -glucanas na nutrição e terapêutica, atuando sobre a ativação do sistema complemento.

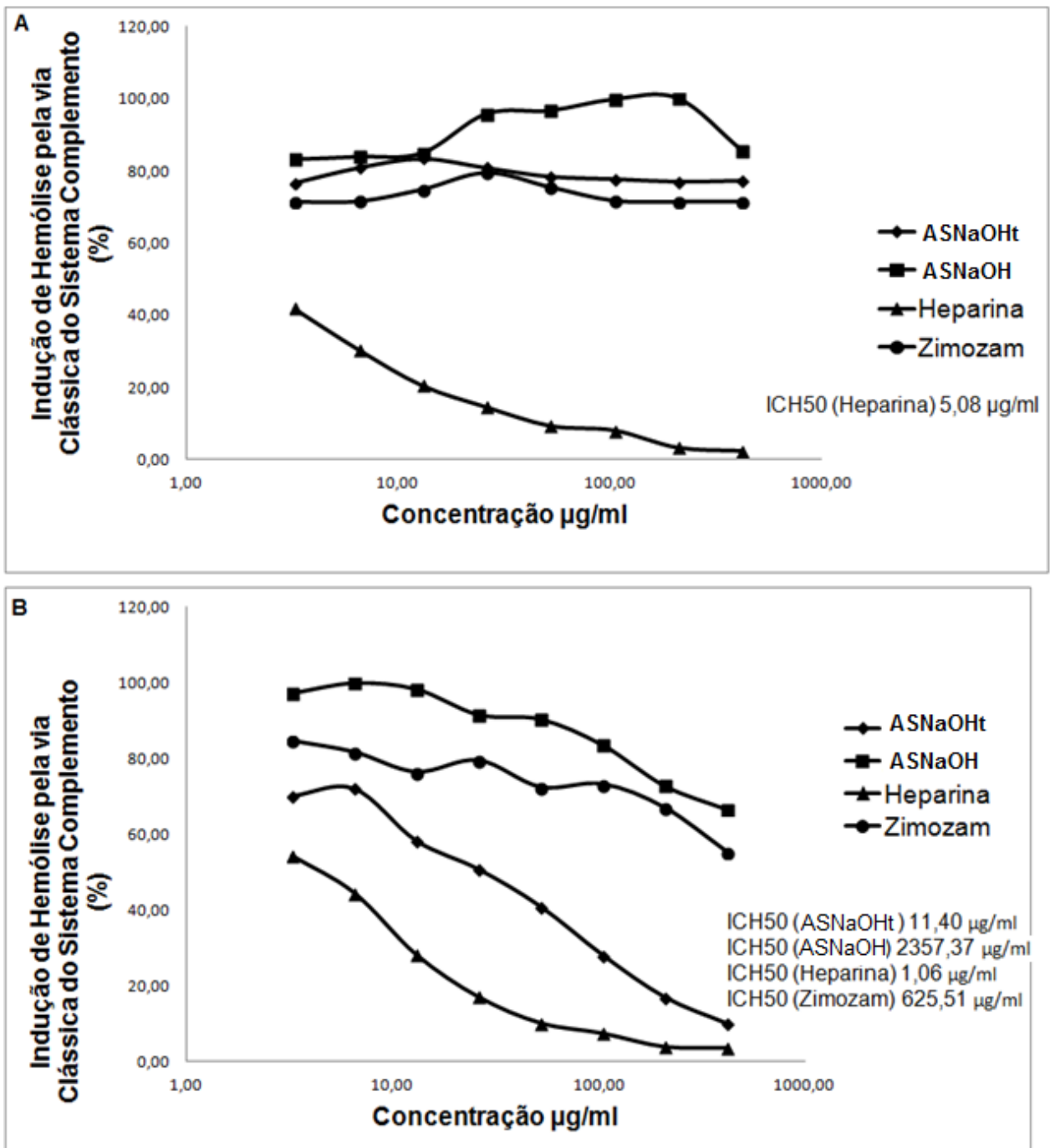


Figura 2. Efeito das frações ASNaOHt e ASNaOH na hemólise induzida pela via clássica do Sistema Complemento de soro humano. (A) Sem pré-incubação; (B) Com pré-incubação de 30 minutos das frações com soro humano. Os valores de ICH50 (concentração da fração necessária para inibir 50% da hemólise induzida pela via clássica do sistema complemento) correspondem à concentração final da fração testada [µg/ml] capaz de reduzir em 50% a atividade hemolítica da papa de eritrócitos. Os resultados são expressos em média de triplicata a partir de três experimentos independentes.

Trabalhos sobre β -glucanas como moléculas ativadoras da via clássica do sistema complemento são escassos, no entanto pesquisas sobre a via alternativa são mais comuns. Czop e Austen (1985) que avaliaram a ação de diferentes fontes de β -glucanas sobre a via alternativa do sistema complemento, descreveram a cevada (cereal da mesma família da aveia) como importante fonte desses polissacarídeos na conformação 1,3 e 1,4 e potencial ativador dessa via do sistema complemento (indução de hemólise de 96%).

Acredita-se que β -glucanas apresentam sua propriedade imunoestimulante dependendo da estrutura, peso molecular e número de ramificações (Brown e Gordon, 2003; Miura et al., 2003; Mantovani et al., 2008). O efeito imunoestimulante dessas moléculas está provavelmente associado à ativação de macrófagos citotóxicos, células *t-helper* e natural killer, ativação da via alternativa do sistema complemento (Bohn e Miller, 1995) e com os dados obtidos no presente estudo também associados com a ativação da via clássica do sistema complemento.

CONCLUSÃO

No presente estudo, foi demonstrada a capacidade das β -glucanas obtidas de grãos de aveia-branca em agir como ativadoras da via clássica do sistema complemento. A partir desses resultados, será possível utilizar essas β -glucanas como imunoestimulantes na terapia e nutrição animal e humana. O uso desse material na forma de suplemento de alimentação e como produto terapêutico na forma injetável (concentrado e liofilizado, pronto para aplicação parenteral) poderá trazer benefícios para o bem-estar humano e animal.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Fernanda Bovo, Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná por sua colaboração técnica.

REFERÊNCIAS

- ALBAN, S. et al. Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. **Planta Medica**, v. 68, n. 12, p. 1118-1124, 2002.
- BOHN, J.A.; MILLER, J.N. (1,3) b-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3–14, 1995.
- BAGNI, M. et al. Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 47, p. 745, 2000.
- BOVO, F. et al. Modulating Effects of Arabinogalactans from Plant Gum Exudates on Human Complement System. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 5, p. 314-320, 2016.
- BOVO, F. et al. Modulating Effects of Arabinogalactans from Plant Gum Exudates on Human Complement System. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 5, p. 314-320, 2016.
- BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal b-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311–315, 2003.

- CHOROMANSKA, A. et al. Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan—An in vitro study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 23-28, 2015.
- COLE, D.S.; MORGAN, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clinical Science**, v. 104, n. 3, p. 455–66, 2003
- CZOP, J.K.; AUSTEN, K.F. Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with human monocyte beta-glucan receptor. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 3388-3393, 1985.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, n. 4, p. 287-297, 1992.
- HAMURO, J.; HADDING, U.; BITTER-SUERMAN, D. Solid phase activation of alternative pathway of complement by beta-1, 3-glucans and its possible role for tumour regressing activity. **Immunology**, v. 34, n. 4, p. 695, 1978.
- KEMPER, C.; ATKINSON, J.P. T-cell regulation: with complements from innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 9–18, 2007.
- MANTOVANI, M.S. et al. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 154-161, 2008.
- MIKKELSEN, M.S. et al. Molecular structure of large-scale extracted β -glucan from barley and oat: identification of a significantly changed block structure in a high β -glucan barley mutant. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 130-138, 2013.

- MIURA, N.N. et al. Structure and biological activities of β -glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. **Microbiology Immunology**, v. 47, p. 173–182, 2003.
- MORGAN, B.P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 32, n. 3, p. 265-298, 1995.
- PAULSEN, B. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Current Organic Chemistry**, v. 5, n. 9, p. 939-950, 2001.
- RUTKOWSKI M. et al. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. **Inflammatory Research**, v. 59, p. 897–905, 2010.
- SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006.
- SERGEEV, A.V. et al. Immunomodulating and antitumor activity of polysaccharides of plant origin. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 100, p. 741 – 743, 1985.
- SUZUKI, T. et al. Activation of the complement system by (1→ 3)- β -D-glucans having different degrees of branching and different ultrastructures. **Journal of Pharmacobiodynamics**, v. 15, n. 6, p. 277-285, 1992.
- TZIANABOS, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 3 – 33, 2000.
- WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 4, p. 1058–66, 2001

ZAINE, L. **Avaliação do efeito de derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre a resposta imune de cães adultos.** 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi observado que a extração aquosa à temperatura de 25 °C foi uma estratégia adequada para obtenção da fração rica em β -glucanas, pois essas moléculas apresentam boa solubilidade em temperaturas mais baixas quando comparadas com polissacarídeos amiláceos (amilose e amilopectina), dessa forma esse tipo de extração é uma alternativa ao uso de tratamento enzimático (com α -amilase) na remoção de amido das frações de aveia. No entanto, a utilização da enzima α -amilase também demonstrou ser uma ótima forma de utilização para remoção de amido. Observando esses dois resultados, o método a ser escolhido deve sempre levar em consideração alguns objetivos como custo e rendimento final da fração. Comparando as duas técnicas, fica evidenciado que a técnica de extração aquosa em temperatura ambiente (25 °C) é muito mais barata por não fazer uso de enzimas comerciais e produtos especializados. Por outro lado, o tratamento enzimático das frações apresentou um maior rendimento final de polissacarídeos de interesse (β -glucanas).

Nessa dissertação, além de métodos de extração de β -glucanas de aveia, foi avaliada a modulação desses polissacarídeos sobre a via clássica do sistema complemento humano. Atualmente, não há relatos de trabalhos descrevendo a modulação dessa via do sistema imunológico, apenas trabalhos avaliando a via alternativa do sistema complemento. Portanto, o esse estudo se torna pioneiro ao avaliar as β -glucanas de aveia como moduladoras da via clássica do sistema complemento. Observando como essas moléculas (β -glucanas) se comportaram nos testes de hemólise (fixação do sistema complemento) e comparando com dados da literatura, podemos afirmar que as frações de β -glucanas obtidas de aveia e utilizadas nos experimentos dessa dissertação, apresentam atividade ativadora da via clássica do sistema complemento. Além disso, os dados de

ICH₅₀ da fração β -glucana quando comparados com os dados de ICH₅₀ da fração heparina corroboram com essa conclusão de moléculas ativadoras.

Após apresentar esses resultados, podemos afirmar que a extração de β -glucanas da aveia é possível e a utilização dessas na alimentação e terapêutica animal e humana é uma fonte alternativa, principalmente pensando na utilização dessas moléculas como promotoras do sistema imunológico, atuando como imunoestimulantes. Sua utilização na forma mais concentrada pode servir como uma forma de suplementação em dietas, tanto animal na forma de ração, como na humana como suplemento nutracêutico. Além disso, o uso na terapêutica propriamente dita é uma opção, pensando em uma alternativa natural imunoestimulante de uso injetável com β -glucanas obtidas da aveia. Um exemplo comercial disponível é o Imunoglucan[®] (Hebron Farmacêutica) que é uma β -glucana obtida da levedura *S. cerevisiae*.

VITA

Douglas Luís Vieira é Médico Veterinário formado pelo Instituto Federal Catarinense (IFC) em 12/2014. Possui experiência desde 2011 nas áreas de Doenças Parasitárias dos animais domésticos, Parasitologia Veterinária, Saúde Pública e Medicina Veterinária do Coletivo. Durante a graduação participou de projetos de extensão nas áreas de Medicina Veterinária do Coletivo e Doenças Parasitárias, trabalhando com cães não-domiciliados atendidos pelo Centro de Bem-estar Animal do Município de São Francisco do Sul, durante o período de 2 anos e meio (2012-2014) sob orientação da Prof^a Dr^a Viviane Milczewski. Participou também em projeto de extensão com crianças da rede pública de Santa Catarina, com objetivo de transmitir conceitos de bem-estar animal durante o ano de 2011. Durante os anos de 2012 e 2013 participou como aluno de iniciação científica voluntário na área de Suinocultura (nutrição e comportamento). Durante o ano de 2014 realizou estágio curricular obrigatório no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná.

Ingressou no Programa de Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná no ano de 2015, sendo vinculado como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior - CAPES. No mês de maio de 2016 defendeu a qualificação de seu projeto com o artigo denominado "Extração e caracterização química de polissacarídeos de aveia-branca (*Avena sativa* L.)", na qual foi aprovado. Durante o período de mestrado publicou resumos, resumos expandidos e outros materiais bibliográficos em sua área de pesquisa (vide abaixo).

No ano de 2016 foi aprovado no Edital 04/2016 para atuar no IFPR como Professor EAD nas disciplinas Planejamento, Programação e Avaliação em Saúde, Vigilância em Saúde: Epidemiológica, Sanitária e Ambiental, e Promoção do Ambiente Saudável do Curso Técnico em Agente Comunitário de Saúde do Instituto Federal do Paraná.

Em Janeiro de 2017 foi aprovado no Processo Seletivo de Residência Multiprofissional da Universidade Federal do Paraná para atuar na área de Medicina Veterinária do Coletivo, sob orientação da Prof^a Dr^a Rita de Cássia Maria Garcia.

Produção Bibliográfica

Publicação de resumos:

Macracanthorhynchus hirundinaceus em Tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) do município de São Francisco do Sul/SC. Autores: **VIEIRA, D. L.**; VANHONI, M.; DIAS de CASTRO, L.; MILCZEWSKI, V. Publicado no 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2015, Curitiba.

Ocorrência de *Contracaecum* spp. em Atobá-pardo (*Sula leucogaster*) no litoral do estado do Paraná. Autores: **VIEIRA, D. L.**; ARNA, G.; DIAS de CASTRO, L.; MOLENTO, M. B. Publicado no 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2015, Curitiba.

Identificação morfométrica de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda: Cyathostominae) de Equinos PSI. Autores: SANTOS, D. W.; MOLENTO, M. B.; DIAS de CASTRO, L.; **VIEIRA, D. L.**; GIESE, E. G. Publicado no 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2015, Curitiba.

Alterações hematológicas e bioquímicas em cães infectados por *Leptospira* spp. Autores: MENDONCA, R.; **VIEIRA, D. L.**; DIAS de CASTRO, L.; JOAQUIM, S. F.; LATOSINSKI, G. S.; MOLENTO, M. B. Publicado no 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2015, Curitiba.

Atrofia de músculos mastigatórios associada ao linfoma em cão. Autores: ARNA, G.; **VIEIRA, D. L.**; PAIVA, L. M. M.; OLIVEIRA, S. T. Publicado no 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2015, Curitiba.

Dioctofimose extra-renal em cães. Autores: ARNA, G.; VASCONCELLOS, A. L. L.; **VIEIRA, D. L.**; DIAS de CASTRO, L.; MOLENTO, M. B. Publicado no 42º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2015, Curitiba.

Prevalence and parasite identification in the gastrointestinal tract of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) from the coast of Brazil. Autores: VANHONI, M.; ARNA, G.; **VIEIRA, D. L.**; LIMA, D.; LIMA, E.; MOLENTO, M. Publicado na 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2015, Liverpool.

Hematologic parameters of Thoroughbred horses naturally infected with Cyathostomins. Autores: DIAS de CASTRO, L.; ABRAHAO, C.; LEITE, V.; **VIEIRA, D. L.**; BUZATTI, A.; MENDONCA, R.; ANTUNES, J.; MOLENTO, M. Publicado na 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2015, Liverpool.

Body growth and development of Thoroughbred horses naturally infected with Cyathostomins. Autores: ABRAHAO, C.; DIAS de CASTRO, L.; MIYAZAKI, C.; **VIEIRA, D. L.**; BUZATTI, A.; MENDONCA, R.; MOLENTO, M. Publicado na 25th International

Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2015, Liverpool.

Prevalência e identificação de parasitas no trato gastrintestinal de Pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) em Pontal do Sul, PR. Autores: VANHONI, M.; **VIEIRA, D. L.**; ARNA, G.; LIMA, D.; MOLENTO, M. B. Publicado no 23º Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 2015, Curitiba.

Avaliação de carga endoparasitária de caprinos da raça Saanen em diferentes grupos etários. Autores: MACEDO, A. R. S.; ROBERTO, F. F. S.; LEITE, L. O.; **VIEIRA, D. L.**; LIMA JUNIOR, V.; ANDRADE JUNIOR, A. L. F. Publicado no XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia e XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitología, 2015, Salvador.

Desenvolvimento de material didático (Recurso Educacional Aberto) intitulado:

“Bicho-geográfico”: Importância e Prevenção da Larva Migrans Cutânea. Autores: **VIEIRA, D. L.**; VANHONI, M.; SILVA, S. S. C.; OLIVEIRA, S. T. Publicado no Acervo Digital da Universidade Federal do Paraná, 2015, Curitiba.

Livro publicado:

Vigilância em Saúde: Epidemiológica, Sanitária e Ambiental. 1. ed. Autor: **VIEIRA, D. L.** Instituto Federal do Paraná, 2016.

Artigo publicado em periódico científico:

Prevalence and quantification of gastrointestinal parasites in *Spheniscus Magellanicus* (Foster, 1781) located in Pontal do Sul, PR, Brazil. Autores: VANHONI, M. S.; ARNA, G.; SPRENGER, L. K.; **VIEIRA, D. L.**; LUIS, L. W.; MOLENTO, M. B. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2017.

- ALBAN, S. et al. Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. **Planta Medica**, v. 68, n. 12, p. 1118-1124, 2002.
- ALRAHMANY, R; TSOPMO, A. Role of carbohydrases on the release of reducing sugar, total phenolics and on antioxidant properties of oat bran. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 413-418, 2012.
- ARAÚJO, E. M. M. et al. Ativação in vitro do sistema complemento como mecanismo imunomodulador induzido pelo mesocarpo de babaçu. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, 2013.
- ARENA, M.P.; RUSSO, P; FIOCCO, D; CAPOZZI; SPANO, G. β -glucans and Synbiotic Foods. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. (Org.). **Probiotics, Prebiotics, and Symbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion**. Londres: Academic Press, 2016. cap. 28, p. 423-430.
- BAGNI, M. et al. Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 47, p. 745, 2000
- BIEL, W.; BOBKO, K.; MACIOROWSKI, R. Chemical composition and nutritive value of husked and naked oats grain. **Journal of Cereal Science**, v. 49, p. 413–418, 2009.
- BOHN, J.A.; MILLER, J.N. (1,3) b-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, p. 3–14, 1995.
- .BOVO, F. et al. Modulating Effects of Arabinogalactans from Plant Gum Exudates on Human Complement System. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 83, n. 5, p. 314-320, 2016.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical**

Biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311–315, 2003.

BUZATTI, A. et al. Ação do óleo de nim frente à teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em testes *in vitro*. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 07-12, 2013.

BUZATTI, A. et al. Acaricide activity in vitro of *Glechon spathulata* Benth. On engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1813-1817, 2011.

CASTRO, G.S.A.; COSTA, C.H.M.; NETO, J.F. Ecofisiologia da aveia branca. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 3, p. 1-15, 2012.

CHOI, E.J.; KIM, C.H.; PARK, J.K. Synthesis and characterization of starch-g-polycaprolactone copolymer. **Macromolecules**, v. 32, n. 22, p. 7402-7408, 1999.

CHOROMANSKA, A. et al. Anticancer properties of low molecular weight oat beta-glucan—An in vitro study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 23-28, 2015.

COLE, D.S.; MORGAN, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clinical Science**, v. 104, n. 3, p. 455–66, 2003.

CZOP, J.K.; AUSTEN, K.F. Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with human monocyte beta-glucan receptor. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 3388-3393, 1985. DESHMUKH, A. O sistema imunológico e seu papel como um sistema protetor para cães. In: **Sistemas de proteção natural em caninos**. São Paulo: Proplan Purina, 2008. p. 1-15.

DAIS, P; PERLIN, A.S. High-field, ^{13}C -NMR spectroscopy of β -D-glucans, amylopectin, and glycogen. **Carbohydrate Research**, v. 100, n. 1, p. 103-116, 1982.

- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, n. 4, p. 287-297, 1992.
- FAHEY, G.C. Prebiotic use by companion animals. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 228, n. 1, p. 36, 2004.
- FOX, J.D.; ROBYT, J.F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v. 195, n. 1, p. 93-96, 1991.
- GHOTRA, B. S.; VASANTHAN, T.; TEMELLI, F. Structural characterization of barley β -glucan extracted using a novel fractionation technique. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 957-963, 2008.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p.1401-1412, 1995.
- GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. (Org.). **Applied Dairy Microbiology**. Nova York: Marcel Dekker, 2001. p.327-343.
- GOMES, M.O.S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal.
- HAMURO, J.; HADDING, U.; BITTER-SUERMAN, D. Solid phase activation of alternative pathway of complement by beta-1, 3-glucans and its possible role for tumour regressing activity. **Immunology**, v. 34, n. 4, p. 695, 1978.

- HARASYM, J.; SUCHECKA, D.; GROMADZKA-OSTROWSKA, J. Effect of raw material size reduction by freeze-milling on beta-glucan recovery process from oat bran. **Journal of Cereal Science**, v. 61, n. 11, 2015.
- HE, S. et al. Isolation and prebiotic activity of water-soluble polysaccharides fractions from the bamboo shoots (*Phyllostachys praecox*). **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 295-304, 2016.
- KHALIGHI, A; BEHDANI, R; KOUHESTANI, S. Probiotics: A Comprehensive Review of Their Classification, Mode of Action and Role in Human Nutrition. In: RAO, V; RAO, L. (Org.). **Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health**. Toronto: InTech, 2016. cap. 2, p. 21-39.
- KEDIA, G.; VÁZQUEZ, J.A.; PANDIELLA, S.S. Evaluation of the fermentability of oat fractions obtained by debranning using lactic acid bacteria. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 4, p. 1227-1237, 2008.
- KEMPER, C.; ATKINSON, J.P. T-cell regulation: with complements from innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 9–18, 2007.
- KOGAN, G; ALFÖLDI, J; MASLER, L. ¹³C-nmr spectroscopic investigation of two yeast cell wall β -D-glucans. **Biopolymers**, v. 27, n. 7, p. 1055-1063, 1988.
- LABANOWSKA, M. et al. The impact of biochemical composition and nature of paramagnetic species in grains on stress tolerance of oat cultivars. **Journal of Plant Physiology**, v. 199, p. 52-66, 2016.
- LENZI, R. M. et al. Effects of aqueous fractions of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC on macrophage modulatory activities. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 767-779, 2013.
- LICHT, T.R.; EBERSBACH, T.; FROKIAER, H. Prebiotics for prevention of gut infections. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 2, p. 70-82, 2012.

- MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal**, v. 18, p. 999-1003, 1999.
- MANTOVANI, M.S. et al. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 154-161, 2008.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.
- MIKKELSEN, M.S. et al. Molecular structure of large-scale extracted β -glucan from barley and oat: identification of a significantly changed block structure in a high β -glucan barley mutant. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 130-138, 2013.
- MIURA, N.N. et al. Structure and biological activities of β -glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. **Microbiology Immunology**, v. 47, p. 173–182, 2003.
- MORGAN, B.P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 32, n. 3, p. 265-298, 1995.
- MURPHY, E. A et al. Benefits of oat β -glucan on respiratory infection following exercise stress: role of lung macrophages. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 5, p. R1593-R1599, 2008.
- PAULSEN, B. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Current Organic Chemistry**, v. 5, n. 9, p. 939-950, 2001.
- PETTOLINO, F. et al. Structure, function and cloning of arabinogalactan-proteins (AGPs): an overview. **Foods and Food Ingredients Journal of Japan**, v. 211, n. 1, p. 12, 2006.
- PIATKOWSKA, E.; WITKOWICZ, R.; PISULEWSKA, E. Podstawowy skład chemiczny wybranych odmian owsa siewnego. **Zywnosc Nauka Technologia Jakosc.** v. 3, n. 70,

p. 88-99, 2010.

POTTER, R.C. et al. **Polysaccharide compositions and uses thereof**. U.S. Patent n. 6,485,945, 26 nov. 2002.

RUNECKLES, V. C. **Recent advances in phytochemistry: proceedings of the ninth annual symposium of the Phytochemical Society of North America**. 9. ed. Indiana, EUA, 2012. 317 p.

RUTKOWSKI M. et al. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. **Inflammatory Research**, v. 59, p. 897–905, 2010.

SAAD, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: O estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAITÔ, H. et al. A ¹³C-NMR-Spectral study of a gel-forming, branched (1→3)-β-d-glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight. **Carbohydrate Research**, v. 58, n. 2, p. 293-305, 1977.

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006.

SERGEEV, A.V. et al. Immunomodulating and antitumor activity of polysaccharides of plant origin. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 100, p. 741 – 743, 1985.

SILVA, L.P.; NORMBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.983-990, 2003.

SILVEIRA, M.L.L. et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear β-D-glucan isolated from *Pleurotus sajor* - caju. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 588-596, 2014.

SINGH, P. et al. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, 2016.

- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SPRENGER, L.K. et al. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre parasitas gastrintestinais de bovinos. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 25-31, 2015a.
- SPRENGER, L.K. et al. Efeito anticoccidiano de extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* em camas de aves contaminadas com *Eimeria* sp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 649-651, 2015b.
- STERNA, V; ZUTE, S; BRUNAVA, L. Oat Grain Composition and its Nutrition Benefice. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 8, p. 252-256, 2016.
- SUZUKI, T. et al. Activation of the complement system by (1→ 3)-β-D-glucans having different degrees of branching and different ultrastructures. **Journal of Pharmacobiodynamics**, v. 15, n. 6, p. 277-285, 1992.
- TZIANABOS, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 3 – 33, 2000.
- VOLMAN, J.J. et al. Dietary (1→ 3), (1→ 4)-β-d-glucans from oat activate nuclear factor-κB in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. **Nutrition Research**, v. 30, n. 1, p. 40-48, 2010.
- WALPORT, M.J. Complement. First of two parts. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 4, p. 1058–66, 2001.
- WORKU, M; MORRIS, A. Binding of different forms of lipopolysaccharide and gene expression in bovine blood neutrophils. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3185-3193, 2009.
- YASUI, H.; OHWAKI, M. Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. **Journal Dairy Science**, v. 74, p. 1187-95, 1991.

ZAINE, L. **Avaliação do efeito de derivados de parede celular de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre a resposta imune de cães adultos.** 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal.